

DER EINFLUSS VON NAHRUNGSPURINEN
AUF DIE ENDOGENE HARNSÄUREBILDUNG

KONSTANTIN MAYERHÖFER

Duss
München
1906



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Poliklinik
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. N. Zöllner

Der Einfluß von Nahrungspurinen auf die endogene Harnsäurebildung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Konstantin Mayerhöfer
aus
Ismaning
1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof.Dr. W. Gröbner
Mitberichterstatter:	Prof.Dr. N. Zöllner
Dekan:	Prof.Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 24. April 1986

Die Untersuchungen zu vorliegender Arbeit wurden in der Zeit von Dezember 1980 bis August 1981 im Purinlabor der Medizinischen Poliklinik der Universität München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. W. Gröbner danke ich herzlich, daß er mir diese Dissertation ermöglicht hat.

Herrn Dr. W. Löffler bin ich für seine Anleitung und Betreuung zu aufrichtigem Dank verpflichtet.

1. Einleitung	1
2. Allgemeiner Teil	2
2.1. Endogene und exogene Harnsäurebildung	2
2.1.1. Endogene Harnsäurebildung	2
2.1.2. Exogene Harnsäurebildung	7
2.2. Serumkonzentration der Harnsäure bei Gesunden und Gichtpatienten	7
2.3. Serumkonzentration der Harnsäure unter purinfreier Diät	8
2.4. Poolgröße und Umsatz der Harnsäure	9
2.5. Ausscheidung der Harnsäure über Nieren und Darm	10
3. Eigene Untersuchungen	11
3.1. Problemstellung	11
3.2. Methodik	12
3.2.1. Versuchspersonen	12
3.2.2. Diät und Purinzulage	12
3.2.3. Bestimmung der endogenen Harnsäurebildung mittels Doppelmarkierungstechnik - Prinzip der Methode	16
3.2.4. Versuchsablauf	16
3.2.5. Methoden	18
3.2.5.1. Harnsäurebestimmung	18
3.2.5.2. Oxypurinbestimmung	22
3.2.5.3. Harnsäureisolierung	29
3.2.5.4. Harnsäureaufschluß zur massenspektrometrischen ¹⁵ N- und ¹³ C-Bestimmung	30
3.2.5.5. Berechnung von Poolgröße, Umsatz und endogener Synthese der Harnsäure	33

3.3. Ergebnisse	36
3.3.1. Harnsäurewerte	36
3.3.2. Poolgröße und Umsatz der Harnsäure	44
3.3.3. Endogene Harnsäurebildung	49
3.3.4. Renale Oxypurinausscheidung	56
3.3.5. Der Einfluß der Uricase-Eigenextinktion auf die Fehlerbreite der Oxypurinbestimmung; Fehlerbreite der Methode bei normaler renaler Oxypurinausscheidung	56
4. Diskussion	64
4.1. Harnsäurewerte in Plasmen und Urinen, renale Harnsäure-Clearance und Urin-pH	64
4.2. Poolgröße und Umsatz der Harnsäure	65
4.3. Endogene Harnsäurebildung	66
4.4. Renale Oxypurinausscheidung; Einfluß der Uricase-Eigenextinktion auf die Fehlerbreite der Oxypurinbestimmung; Fehlerbreite der Methode bei normaler renaler Oxypurinausscheidung	73
5. Zusammenfassung	78
6. Literaturverzeichnis	79
7. Lebenslauf	85

1. Einleitung

Die primäre Hyperurikämie und Gicht kann durch vermehrte Bildung oder verminderte renale Ausscheidung der Harnsäure zustande kommen. Vermehrte Synthese ist wahrscheinlich bei weniger als einem Prozent aller Patienten die Ursache der Hyperurikämie (Enzymdefekte des Purinstoffwechsels); in der klinischen Medizin kann man davon ausgehen, daß beim ersten Auftreten eines Gichtanfalls im mittleren und höheren Alter so gut wie immer ein renaler Sekretionsdefekt für Harnsäure besteht.

Die Einteilung in primäre und sekundäre Hyperurikämie hängt bei einem Teil der zugrunde liegenden Störungen von der Definition der Begriffe primär und sekundär ab; verminderte Ausscheidung und vermehrte Synthese der Harnsäure kommen auch gemeinsam vor (Glucose-6-phosphat-Dehydrogenasemangel). Man hat die durch den angeborenen renalen Sekretionsdefekt für Harnsäure entstehende Hyperurikämie vereinzelt als sekundäre Störung bezeichnet, da die Manifestation dieser Störung von unzureichender Ernährung abhängen kann.

An erster Stelle der Liste der Nahrungsfaktoren, die den Harnsäurestoffwechsel beeinflussen, stehen die Purine. Mit Hilfe oraler Zufuhr chemisch definierter Purinquellen, erstmals von Nugent und Tylor 1959 (32) angewandt, hat man nachweisen können, daß Serum- und Urinharnsäure mit der Dosis der zugeführten Purine linear ansteigen (47). Diese Gesetzmäßigkeit gilt für alle bisher untersuchten Purine, der Anstieg ist jedoch bei verschiedenen Purinverbindungen unterschiedlich.

Aus den genannten experimentellen Ergebnissen wurde geschlossen, daß die endogene Purinsynthese durch oral zugeführte Purine nicht beeinflußt wird (49). Diese Schlußfolgerung sollte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des Einbaus markierter Harnsäurevorläufer in die Urinharnsäure bei gesunden Versuchspersonen überprüft werden.

2. Allgemeiner Teil

2.1. Endogene und exogene Harnsäurebildung

2.1.1. Endogene Harnsäurebildung

Der Körper kann seinen Bedarf an Purinnukleotiden decken, indem er das Purinskelett aus mehreren kleinen Molekülen aufbaut. Purine sind also kein essentieller Bestandteil der Nahrung. Die Synthese beginnt mit Ribose-5-phosphat, an das schrittweise die von Glycin, Formiat und CO_2 gelieferten C-Atome sowie die von Glutamin, Glycin und Asparat gelieferten Stickstoffatome angebaut werden. Endprodukt der Purinbiosynthese ist das IMP (Inosin-Monophosphat) (Abbildung 1). Aus IMP entstehen über jeweils ein Zwischenprodukt AMP (Adenosin-Monophosphat) und GMP (Guanosin-Monophosphat). Die drei Nukleotide können ineinander umgewandelt, zu Nukleosid-Diphosphaten und -Triphosphaten aufgebaut oder mit Hilfe der spezifischen 5'-Nukleotidasen und der unspezifischen alkalischen Phosphatasen zu Nukleosiden abgebaut werden. Ein Schema des Purinstoffwechsels und seiner Regulation ist in Abbildung 2 dargestellt.

Beim Abbau der Nukleoside entstehen aus Inosin und Guanosin die Basen Hypoxanthin bzw. Guanin. Adenosin wird dagegen zu Inosin desaminiert und über Hypoxanthin abgebaut. Adenin entsteht im menschlichen Stoffwechsel nicht aus Adenosin, wird aber mit Hilfe der Adenin-Phosphoribosyltransferase (s. unten) in den Nukleotidstoffwechsel eingeschleust. Aus Guanin entsteht beim weiteren Abbau Xanthin. Die Xanthinoxidase oxydiert Hypoxanthin zu Xanthin und Xanthin zu Harnsäure.

Neben Harnsäure finden sich im menschlichen Urin Hypoxanthin und Xanthin in geringen Mengen. Da weitere Purine beim Gesunden nur in Spuren ausgeschieden werden, gibt die mit Hilfe enzymatischer Methoden einfach zu messende Summe von Hypoxanthin, Xanthin und

Harnsäure die Gesamtpurinausscheidung mit ausreichender Genauigkeit an. Hypoxanthin und Xanthin gemeinsam machen beim Gesunden maximal 5 bis 8 Prozent der Gesamtpurinausscheidung aus.

Harnsäure kann im menschlichen Körper nicht weiter abgebaut werden und wird deshalb mit Recht als Endprodukt des Purinstoffwechsels bezeichnet. Xanthin wird einerseits zu Harnsäure oxidiert, andererseits kann es mit Hilfe der HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) zu XMP (Xanthin-Monophosphat) aufgebaut werden. Diese Reaktion verläuft allerdings in vitro mit einer um den Faktor 100 geringeren Geschwindigkeit als die vom gleichen Enzym katalysierten Reaktionen mit Hypoxanthin und Guanin, die Reaktion ist deshalb in vivo vermutlich bedeutungslos. Xanthin muß deshalb ebenfalls als Endprodukt bezeichnet werden. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, daß bei Patienten mit Xanthinurie, einem angeborenen Mangel an Xanthinoxidase, die Xanthinausscheidung wesentlich größer als die von Hypoxanthin ist (19).

Die Regulation der Purinbiosynthese erfolgt durch negative Rückkopplung sowie durch die intrazelluläre Konzentration von PRPP (Phosphoribosyl-Pyrophosphat). Holmes et al. (18) konnten zeigen, daß die Endprodukte der Purinbiosynthese, die Nukleotide IMP, AMP und GMP, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym, die PRPP-Glutamin-Amidotransferase hemmen, wobei die Enzymkonfiguration sich ändert. Durch erhöhte Konzentrationen von PRPP wird diese Konfigurationsänderung rückgängig gemacht mit der Folge, daß die Purinbiosynthese gesteigert wird. Die intrazellulären PRPP-Konzentrationen liegen um den Faktor 10 bis 100 unter der Michaelis-Menten-Konstante der PRPP-Glutamin-Amidotransferase, geringe Konzentrationsänderungen von PRPP führen deshalb zu ausgeprägten Veränderungen der Enzymaktivität.

Die beim Abbau der Nukleotide anfallenden freien Basen Adenin, Guanin und Hypoxanthin können mit Hilfe der Enzyme APRT (Adenin-Phosphoribosyl-Transferase) und HPRT zum Nukleotid in einem

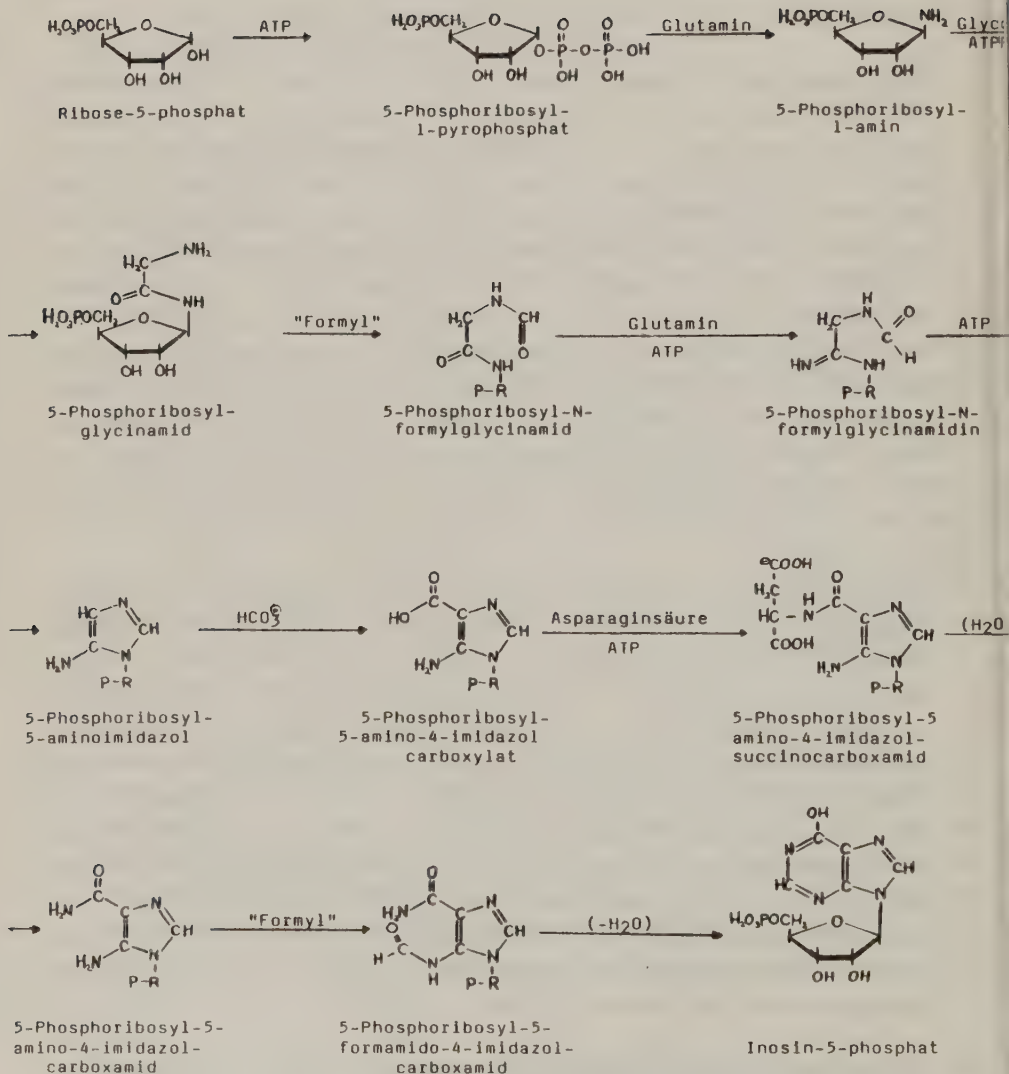


Abb. 1: Purinbiosynthese (nach Wyngaarden und Kelley, 1972)

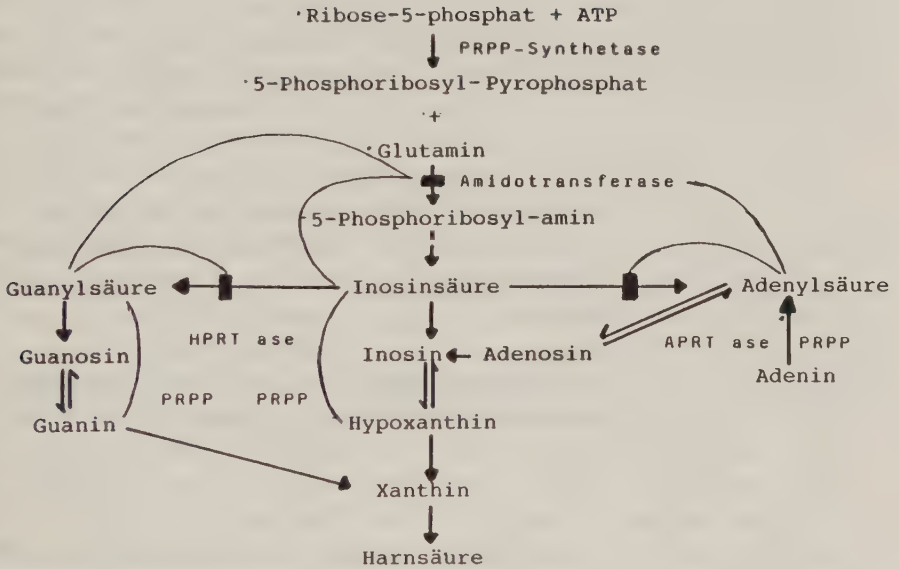


Abb. 2: Schematische Darstellung des Purinstoffwechsels und seiner Regulation (13)

⊥ = Hemmung der Reaktion

Schritt aufgebaut werden, wobei PRPP verbraucht wird ("salvage pathway", Wiederverwertungsstoffwechsel). Der Energiebedarf für diese Reaktionen ist sehr viel geringer als für die Biosynthese aus kleinen Bruchstücken. Der normale Nukleotidstoffwechsel ist auf das Zusammenwirken der Biosynthese und der HPRT angewiesen. Bei partiellem oder vollständigem Mangel an HPRT wird einerseits im salvage pathway weniger PRPP verbraucht, andererseits sinkt die Nukleotidsynthese, wodurch die Rückkopplungshemmung auf die PRPP-Glutamin-Amidotransferase vermindert wird. Zur Aufrechterhaltung normaler Nukleotidkonzentrationen wird deshalb die Purinbiosynthese gesteigert (21). Da die vermehrt anfallenden Basen nicht wieder verwertet werden können, kommt es zur Vermehrung der endogenen Harnsäurebildung. Die Beschleunigung der Purinbiosynthese infolge einer gesteigerten Aktivität der PRPP-Synthese führt zum selben Ergebnis, vermutlich deshalb, weil die HPRT auch bei normaler Aktivität nicht in der Lage ist, die vermehrt anfallenden Basen zu verwerten.

Im Gegensatz zur HPRT spielt die APRT bei der Regulation der Purinbiosynthese offensichtlich keine (entscheidende) Rolle. Die Purinbiosynthese wird auch bei vollständigem Fehlen des Enzyms nicht gesteigert. Adenin kann mit Hilfe der Xanthinoxidase zu 2,8-Dihydroxyadenin oxydiert werden, das aufgrund seiner extrem schlechten Wasserlöslichkeit zu Nephrolithiasis und Niereninsuffizienz führt. Da dies durch normale APRT-Aktivität verhindert wird, hat man die Funktion des Enzyms als "Entgiftung" bezeichnet (37).

Die endogene renale Harnsäureausscheidung beträgt nach Seegmiller et al. (35), die eine purinarmer Diät verwendeten, 426 ± 86 mg/Tag bei gesunden Männern. Unter purinfreier Formeldiät finden sich Werte von durchschnittlich 326 mg/Tag (27).

2.1.2. Exogene Harnsäurebildung

Neben der endogenen Purinsynthese nimmt der Körper auch mit der Nahrung zugeführte Purine auf. Die Nukleoproteine werden im Darm durch proteolytische Enzyme in Nukleinsäuren zerlegt, diese teilweise weiter zu Nukleotiden abgebaut. Zum Abbau der Nukleotide bis zur Harnsäure sind in der Mukosa des Darms sämtliche Enzyme vorhanden. Ob die im Darmsaft nachweisbare Harnsäure aus den an Ort und Stelle abgebauten Nahrungspurinen stammt und/oder mit Sekreten dorthin gelangt, läßt sich gegenwärtig nicht sicher sagen. Resorbiert werden Purine vermutlich in Form von Nukleosiden und Basen (11).

Wieviel von den Nahrungspurinen resorbiert wird, hängt von ihrer Zusammensetzung ab. RNS (Ribonukleinsäure) führt zu einem stärkeren Anstieg der Serum- und Urinharnsäure als DNS (Desoxyribonukleinsäure). Die Resorption von AMP und GMP ist nach Zöllner et al. (47) sogar quantitativ. Die Basen werden in unterschiedlichem Ausmaß resorbiert, wobei vermutlich die Wasserlöslichkeit der jeweiligen Substanz die entscheidende Rolle spielt.

2.2. Serumkonzentration der Harnsäure bei Gesunden und Gichtpatienten

Ernährung, Alter und Geschlecht beeinflussen beim Menschen die Serumharnsäurekonzentration. So fand Zöllner bei zwei Untersuchungen 1962 und 1971 (46, 9) einen Anstieg der mittleren Serumharnsäure bei Männern von 4,9 auf 6,0 mg/100 ml in vergleichbaren Kollektiven. Zugeschrieben wird dies der Änderung der Ernährungsgewohnheiten.

Die Abhängigkeit vom Alter zeigt die Tecumseh-Studie (30). Danach steigt bei beiden Geschlechtern die Serumharnsäure vom 4. Lebensjahr bis zur Pubertät um 0,8 mg/100 ml an. Während der Pubertät nimmt sie bei Knaben stärker zu und liegt bei erwachsenen Männern

durchschnittlich bei 4,9 mg/100 ml. Frauen zeigen nach der Pubertät einen Serumspegel von 4,2 mg/100 ml, der während der Menopause fast den Serumspegel der Männer erreicht.

Einen statistischen Normalwert der Serumharnsäure festzulegen, ist problematisch, da die Serumkonzentration von den obengenannten Faktoren abhängt. Man kann den Normalwert auch nach physikochemischen oder klinischen Gesichtspunkten definieren. Physikochemisch wäre die obere Normgrenze die Löslichkeit von Natriumurat (6,4 mg/100 ml bei 37°). Der Wert 6,5 mg/100 ml ist auch für eine klinische Definition geeignet, denn Gichtanfälle kommen nach der Framinghamstudie (15) unterhalb dieses Serumwerts praktisch nicht vor. Die Wahrscheinlichkeit, einen Gichtanfall bei einer Serumkonzentration von 7 - 7,9 mg/100 ml zu bekommen, liegt bei ca. 12%, 36% erkranken bei über 8 mg/100 ml, und bei über 9 mg/100 ml ist ein Gichtanfall nahezu gewiß.

Aufgrund epidemiologischer Untersuchungen wird oft die obere Normgrenze für Frauen niedriger angesetzt als für Männer. Löffler (23) definiert eine Serumharnsäure über 6,5 mg/100 ml bei Männern und Frauen als Hyperurikämie. Die untere Grenze wird auf 2,0 mg/100 ml festgelegt. Dabei handelt es sich um eine willkürlich festgelegte Größe, die aber nach statistischen Definitionen sinnvoll ist, da ca. 1% aller Patienten eine Serumkonzentration unter 2,0 mg/dl zeigen.

2.3. Serumkonzentration der Harnsäure unter purinfreier Diät

Bei Untersuchungen von Umsatz, Poolgröße und endogener Synthese der Harnsäure ist es nötig, ein Gleichgewicht des Harnsäurestoffwechsels herzustellen. Dies erreicht man am besten durch eine purinfreie flüssige Formeldiät, die 10 Tage vor Beginn des Experiments eingenommen wird. Nach dieser Zeit hat sich ein Gleichgewicht eingestellt, Serum- und Urinharnsäurekonzentration sind konstant. Der Harnsäureumsatz entspricht bei purinfreier isoenergetischer Diät der endogenen Harnsäurebildung. Isoenergetisch muß die Diät deswegen sein, weil durch Gewichtsänderung und damit

verbundenen Gewebsan- oder -abbau Purine freigesetzt oder verbraucht werden. Nach Löffler et al. (25) beträgt die Serumkonzentration der Harnsäure bei dieser Diät $3,28 \pm 0,68$ mg/dl bei Frauen und $4,03 \pm 0,74$ mg/dl bei Männern.

2.4. Poolgröße und Umsatz der Harnsäure

Die Gesamtmenge der im Körper vorhandenen Harnsäure wird als Harnsäurepool bezeichnet. Diesen Pool speisen die endogene Harnsäuresynthese und die mit der Nahrung zugeführten Purine. Der Zufluß des Pools wird durch die vorhandene Harnsäuremenge nicht beeinflusst, die Ausscheidung dagegen ist konzentrationsabhängig; sie nimmt beim Gesunden mit zunehmender Serumharnsäurekonzentration zu, d.h., die renale Clearance steigt an. Die Poolgröße gesunder erwachsener Männer liegt unter verschiedenen purinarmen Diäten bei 805 - 1600 mg, die der Frauen bei 541 - 687 mg (23). Die Umsatzrate ist diejenige Harnsäuremenge, die pro Zeiteinheit durch den Pool fließt. Sie kann nur bei konstanter Ein- und Ausfuhr bestimmt werden und beträgt bei gesunden Männern im Mittel 68% des Pools.

Eine direkte Messung des Harnsäureumsatzes kann nur unter unphysiologischen Bedingungen (Bakteriostase des Darms) durchgeführt werden, da 15 - 30% der Harnsäure über den Gastrointestinaltrakt ausgeschieden und dort bakteriell abgebaut werden. Näherungsweise kann die Poolgröße aus Serumharnsäure und Körpergewicht berechnet werden (45).

Eine andere, indirekte Möglichkeit stellt die Isotopenverdünnungsmethode dar, die im Kapitel Methodik beschrieben wird.

2.5. Ausscheidung der Harnsäure über Nieren und Darm

Da der Mensch die Fähigkeit verloren hat, Harnsäure zu Allantoin abzubauen, stellt die Harnsäure das Endprodukt des Purinstoffwechsels dar. Ungefähr 15 - 30% der gebildeten Harnsäure werden in den Magen-Darmtrakt sezerniert und dort bakteriell bis zu NH_3 und CO_2 abgebaut. Bei der Ausscheidung über die Nieren sind Filtration, tubuläre Rückresorption und Sekretion beteiligt. Aus diesem Zusammenspiel ergibt sich beim Gesunden eine Harnsäureclearance von $8,7 \pm 2,5$ ml/min unter Normalkost (10).

Durch diätetische und medikamentöse Beeinflussung kann der über Nieren und Darm ausgeschiedene Anteil des Harnsäureumsatzes sich vermutlich ändern. Eiweißzulagen führen zu einer Vermehrung der renalen Harnsäureausscheidung, wobei die Serumharnsäurespiegel bei verschiedenen Untersuchungen unterschiedliche Tendenzen zeigen (40, 5, 24). Die dabei erhöhte renale Clearance spricht ebenso wie die Untersuchung mittels Isotopen von Bowering et al. (5) für eine Zunahme der renalen auf Kosten der enteralen Ausscheidung. Dieselbe Änderung tritt bei urikosurischer Behandlung ein. Körper eigene Säuren wie Milchsäure und Ketosäuren hemmen die renale Harnsäureausscheidung, weshalb bei körperlicher Belastung und ausgiebigem Alkoholgenuß (Laktatanstieg) die Serumharnsäure ansteigt. Der Harnsäurespiegel wird zusätzlich durch den beträchtlichen Puringehalt einiger Alkoholika erhöht. Inwieweit bei der verminderten Harnsäureausscheidung über die Niere kompensatorisch eine Erhöhung der Ausscheidung über den Darm erfolgt, ist nicht bekannt. Man weiß jedoch, daß z. B. bei Niereninsuffizienz die enterale Harnsäureausscheidung erhöht ist (39). Der Darm stellt dabei den Hauptausscheidungsweg für die Harnsäure dar und nimmt bis zu 80% des Umsatzes auf.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Problemstellung

In früheren Arbeiten wurde eine Verminderung der Purinsynthese durch exogene Purine in verschiedenen biologischen Systemen beobachtet, so von Abrams (1) in Knochenmarkszellen von Kaninchen, von Gots (8) in Bakterienmutanten, von Nierlich und Magasanik (31) in Mäusefibroblasten und von Henderson (16) in Aszitestumorzellen.

Bei in vitro-Versuchen konnten Holmes et al. (18) zeigen, daß die Purinsynthese durch AMP, IMP und GMP gehemmt wird.

Beim Menschen fanden Seegmiller et al. (36) einen verminderten Einbau von Glyzin-Isotopen in die Urinharnsäure, wenn gleichzeitig Adenin oder Aminoimidazolkarboxamid gegeben wurde. Dieser Befund wurde als Ausdruck einer Hemmung der endogenen Harnsäuresynthese interpretiert. Bei Zulage von Nahrungspurinen zu einer Basisdiät findet sich jedoch ein dosisabhängiger linearer Anstieg der Serum- und Urinharnsäure (47), ein Ergebnis, das mit einer Hemmung der endogenen Synthese durch exogene Purine nicht vereinbar ist.

Um diesen Widerspruch zu klären, sollte in der vorliegenden Arbeit die endogene Harnsäuresynthese mittels Einbau von ^{15}N -Glycin einmal unter prinfreier Formeldiät und in einem zweiten Versuch unter zusätzlicher Purinzufuhr untersucht werden.

3.2. Methodik

3.2.1. Versuchspersonen

Versuchspersonen für diese Arbeit waren zwei gesunde Medizinstudenten (B.G., weiblich, K.M., männlich). Die Daten der Versuchspersonen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

3.2.2. Diät und Purinzulage

Wir verwendeten eine halbsynthetische, isoenergetische, purinfreie Formeldiät, die sich aus 15% Eiweiß, 30% Fett und 55% Kohlenhydraten zusammensetzte. Die folgenden Berechnungen gelten für 1000 kcal.

Eiweiß (15%): 150 kcal werden durch Eiweiß gedeckt. Da 1 g Eiweiß einen Brennwert von 4,1 kcal hat, benötigt man 36,6 g Eiweiß. Wir verwendeten dazu MMSP (Magermilchsprühpulver, Bayerische Milchindustrie, Landshut), das 35% Eiweiß enthält. Für 150 kcal aus Eiweiß benötigt man somit 104,5 g MMSP.

Fett (30%): Da Fett einen Brennwert von 9,3 kcal hat, benötigt man 32,3 g Fett, um 300 kcal zu erhalten. Im MMSP sind 0,73% Fett enthalten. 104,5 g MMSP liefern also 0,76 g Fett. 31,5 g Fett wurden in Form von Livio-Öl (Union Deutsche Lebensmittelwerke, Hamburg) zugeführt, das zu nahezu 100% aus Fett besteht. 1 g Livio-Öl entspricht 1,1 ml, es wurden somit 34,7 ml benötigt.

	B.G.	K.M.
Geschlecht	weiblich	männlich
Alter	29	28
Gewicht (kg) 1. Diätphase	54,5	61,8
Gewicht (kg) 2. Diätphase	52,5	62,8
Größe (cm)	157	178
Körperoberfläche (m ²)	1,52	1,77

Tab. 1: Daten der Versuchspersonen

Kohlenhydrate (55%): Bei einem Brennwert von 4,1 kcal benötigt man 134,1 g Kohlenhydrate zur Deckung von 550 kcal. Im MMSP sind 47% entsprechend 49,1 g Kohlenhydrate enthalten. Die restlichen 85 g wurden in Form von Maltodextrin (Maizena, Hamburg) zugesetzt. Maltodextrin besteht zu 94,5% aus Glucose-Oligomeren, so daß 89,9 g davon hinzugefügt werden müssen.

Die erforderliche Kalorienmenge wurde nach der Körperoberfläche berechnet (Nomogramm nach Dubois und Dubois). Der nach Geschlecht, Alter und Körperoberfläche aus den Tabellen von Boothby et al. entnommene Grundumsatz wurde mit dem Faktor 1,7 multipliziert, der dem Arbeitsumsatz bei leichter körperlicher Arbeit, z. B. Büroarbeit, entspricht (44).

Die für die Versuchspersonen pro Tag erforderlichen Mengen der einzelnen Bestandteile wurden mit 1000 ml Wasser vermischt und auf vier Portionen verteilt.

Drei Tage nach Beginn der Diät traten bei Versuchsperson B.G. Durchfälle auf, die auf eine Unverträglichkeit des Milchzuckers im MMSP zurückgeführt wurden. Die Diät wurde daraufhin mit Hilfe des Eiweißkonzentrats Hyperprotidine^R (Nestlé, Vevey) hergestellt, das laktosefrei ist und zu etwa 94% aus Eiweiß besteht.

Während der 1. Versuchsperiode wurde die Diät allein gegessen, während der 2. Versuchsperiode zusätzlich je 1 g AMP und GMP pro 1,73 m² Körperoberfläche. Die Nukleotide wurden als Dinatriumsalz (AMP · 6 H₂O Na₂, GMP · 5H₂O Na₂; Boehringer Mannheim) zugeführt, die eingenommenen Mengen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Als Getränke waren während der Einnahme der Formeldiät koffeinfreier Kaffee (Hag, Bremen) und Mineralwasser erlaubt, Vitamine wurden in Form eines Multivitaminpräparats (Multibionta forte^R, Merck, Darmstadt) substituiert. Elektrolyte waren in ausreichender Menge im MMSP enthalten (Empfehlungen für die Nährstoffzufuhr, DGE, 1976).

1. Diätphase	B.G.	K.M.
	2100 kcal	3000 kcal
Livio (ml)	74,5	104,1
MMSP (g)	-	313,5
Maltodextrin (g)	297,9	209,7
Hyperprotidine (g)	83,6	-

2. Diätphase	B.G.	K.M.
	2100 kcal	3000 kcal
Livio (ml)	74,5	104,1
MMSP (g)	-	313,5
Maltodextrin (g)	297,9	209,7
Hyperprotidine (g)	83,6	-
AMP · 6 H ₂ O Na ₂ (g)	1,26	1,47
GMP · 5 H ₂ O Na ₂ (g)	1,19	1,4

Tab. 2: Diätzusammensetzung der Versuchspersonen

3.2.3. Bestimmung der endogenen Harnsäurebildung mittels Doppelmarkierungstechnik - Prinzip der Methode

Als Maß für die Größe der endogenen Harnsäurebildung diene der Einbau von Isotopen in die Harnsäure nach Zufuhr einer markierten Substanz (^{15}N -Glycin oral), die bei der Purinbiosynthese als Substrat dient. Da der über den Darm ausgeschiedene Teil des Harnsäureumsatzes wegen des bakteriellen Abbaus nicht erfaßt werden kann, muß gleichzeitig der Gesamtharnsäureumsatz nach dem Isotopenverdünnungsprinzip (^{13}C -markierte Harnsäure i.v.) gemessen werden. Das Prinzip der Doppelmarkierungstechnik ist in Abbildung 3 dargestellt.

3.2.4. Versuchsablauf

Die Untersuchungen unter Formeldiät wurden über 2 x 21 Tage durchgeführt. Die ersten 10 Tage dienten jeweils zur Einstellung eines Stoffwechselgleichgewichts, am Morgen des 11. Tages wurden die markierten Substanzen zugeführt, Harnsäure i.v. im Nüchternzustand, Glycin oral mit dem anschließenden Frühstück. Die injizierten Harnsäuremengen sind in Tabelle 10 angegeben, die Glycindosis betrug 67 mg/kg Körpergewicht entsprechend 3,5 g bei Versuchsperson B.G. und 4,1 g bei Versuchsperson K.M. Für die Versuchsperson K.M. betrug die Menge an Stickstoff (Molekulargewicht 75) $\frac{14}{75} \times 4,096 = 764,59 \text{ mg N}$.

Das verabreichte Glycin war mit 95,1 Atom% ^{15}N angereichert. Unter Berücksichtigung der natürlichen Häufigkeit (0,365 Atom%) ergeben sich 94,735 Atom% ^{15}N -Überschuß. Das verabreichte Glycin enthielt somit $764,59 \times 0,94735 = 724,33 \text{ mg } ^{15}\text{N}$.

Bei Versuchsperson B.G. errechnen sich 619,64 mg ^{15}N .

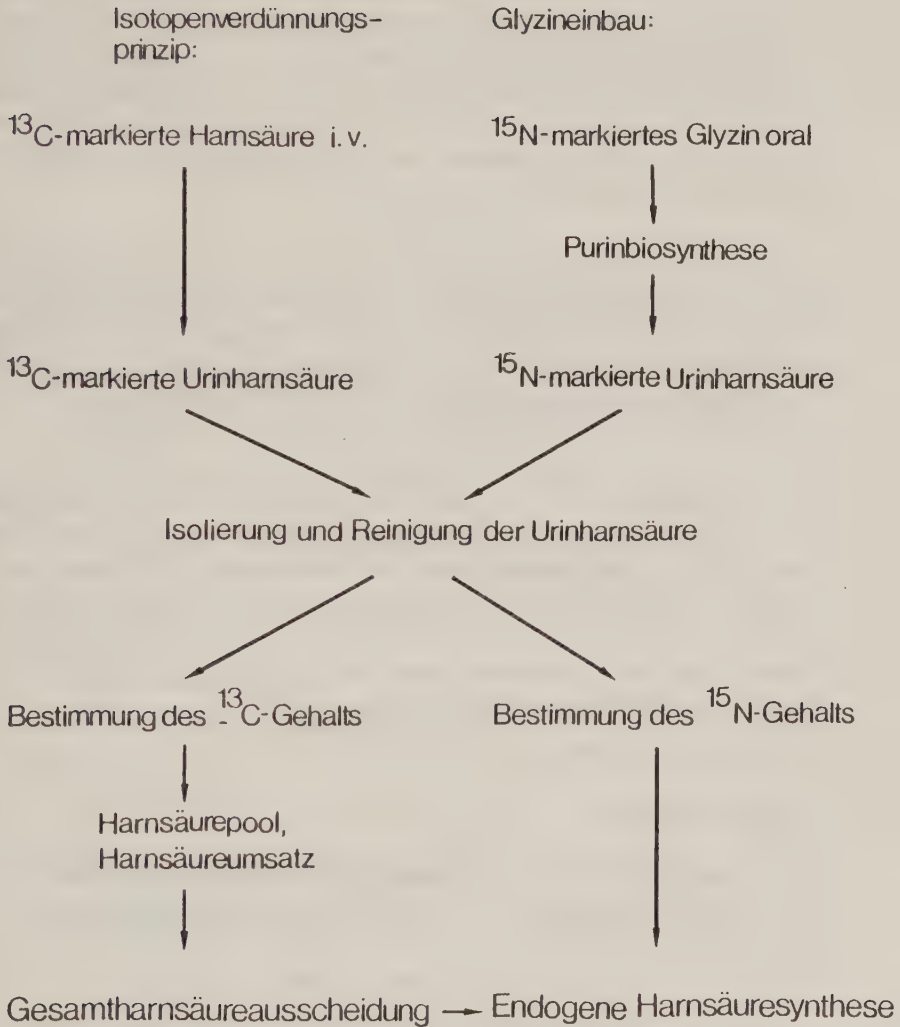


Abb. 3 : Prinzip der Bestimmung der endogenen Harnsäurebildung mittels Doppelmarkierung

Während der ersten 10 Tage wurde der Urin in 24 h-Portionen, nach Zufuhr der markierten Substanzen 6 Tage lang in 12 h-Portionen, anschließend nochmals 5 Tage lang in 24 h-Portionen gesammelt. Blutentnahmen erfolgten morgens nüchtern in zweitägigem Abstand (0 bis 8 Tage) bzw. täglich (8 bis 21 Tage). Es wurden jeweils 10 ml Heparinblut entnommen, frisch zentrifugiert und das Plasma bei -20° bis zur Harnsäurebestimmung eingefroren.

Die zweite Versuchsperiode unterschied sich von der ersten durch die Nukleotidzulage zur Diät, im übrigen waren die beiden Untersuchungen unter Formeldiät identisch. Nach den Untersuchungen unter Formeldiät wurde weiter in zunächst 3-, dann 6-, dann 10-tägigem Abstand unter Normalkost 24 h-Urin gesammelt und jeweils am Anfang und Ende der Sammelperiode Heparinblut entnommen.

Zur Bestimmung des ^{13}C - und ^{15}N -Gehalts der Urinharnsäure wurde aus den letzten beiden Sammelurinen der Vorperiode sowie aus sämtlichen Sammelurinen nach Isotopenzufuhr die Harnsäure isoliert. Die ^{13}C -Bestimmung erfolgte jeweils bis zum Ende der Formeldiät-Periode, der ^{15}N -Gehalt der Urinharnsäure wurde bis zum Abfall auf die natürliche Häufigkeit verfolgt, was nach beiden Versuchsperioden ca. 4 Monate dauerte.

3.2.5. Methoden

Die Chemikalien für alle folgenden Untersuchungen wurden, soweit nicht anders angegeben, aus der Apotheke der Universität München bezogen.

3.2.5.1. Harnsäurebestimmung

Zur Harnsäurebestimmung verwendeten wir das enzymatische Verfahren nach Zöllner (46).

Prinzip der Methode:

Harnsäure wird durch Uricase im alkalischen Milieu vollständig zu Allantoin abgebaut, wodurch die typische Absorptionsbande bei 293 nm verschwindet.



Lösungen:

Glycinpuffer 2/3 molar, pH 9,3 (Stammlösung)

Glycinpuffergebrauchslösung = Glycinpufferstammlösung 1:10 verdünnt mit Aqua bidest.

Uricase (Løvens Kemiske Fabrik, Kopenhagen) 75 U/Ampulle, Inhalt einer Ampulle gelöst in 25 ml Glycinpuffergebrauchslösung.

Für alle Bestimmungen wurde das Beckman-Photometer Modell 25 verwendet.

Für die Photometrie wurden folgende Ansätze hergestellt:

1.) Bestimmung der Eigenextinktion der Uricase (E_U):

2 ml Puffer- gebrauchslösung		3ml Puffer- gebrauchslösung
	gemessen gegen	
1 ml Uricase- gebrauchslösung		

2.) Bestimmung des Extinktionsabfalls in der Probe (E_{HS}):

2 ml verdünntes Plasma oder Urin		2 ml verdünntes Plasma oder Urin
	gemessen gegen	
1 ml Puffer- gebrauchslösung		1 ml Uricase- gebrauchslösung

Zur Messung wurden 1 cm-Quarzküvetten verwendet.

Es ergibt sich für die Berechnung der Plasmaharnsäure unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren folgende Gleichung:

$$\frac{(E_U + E_{HS}) \times 3 \times 25 \times 100}{0,0745 \times 2 \times 1000} = \text{Plasmaharnsäure mg/dl}$$

Durch Aufrunden des Extinktionskoeffizienten und Kürzen ergibt sich

$$(E_U + E_{HS}) \times 50 = P_{HS}$$

Für die Urinharnsäure (Verdünnung 1:125) lautet die Gleichung

$$(E_U + E_{HS}) \times 250 = U_{HS}$$

Alle Harnsäurebestimmungen wurden als Doppelbestimmungen ausgeführt, vor jeder Bestimmungsserie wurde eine Eichkurve erstellt aus einer Lösung, die aus 8 mg Harnsäure in 100 ml Puffergebrauchslösung bestand (Abbildung 4).

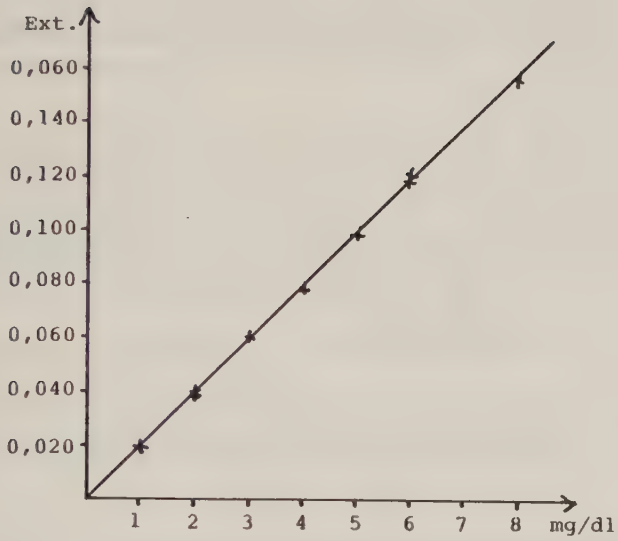


Abb. 4: Eichkurve zur Harnsäurebestimmung

3.2.5.2. Oxypurinbestimmung

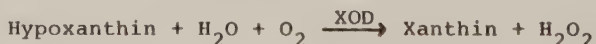
Prinzip der Methode:

Bei Bestimmung der Oxypurinkonzentration (Oxypurine = Summe von Xanthin und Hypoxanthin) wird im ersten Ansatz die vorhandene Harnsäure enzymatisch bestimmt. In einem zweiten Ansatz werden durch Zusatz von XOD (Xanthinoxydase) Hypoxanthin und Xanthin in Harnsäure übergeführt, dann erneut die Harnsäurekonzentration mittels Uricase bestimmt.

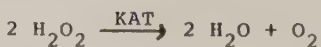
Die Konzentrationen von Hypoxanthin und Xanthin können somit nicht getrennt angegeben werden; man erhält die Summe ihrer Konzentrationen als Harnsäureäquivalente (d.h. eine Oxypurinkonzentration von z.B. 100 mg Harnsäure/dl entspricht einer Hypoxanthinkonzentration von $\frac{136}{168} \times 100 = 81$ mg Hypoxanthin/dl oder $\frac{152}{168} \times 100 = 91$ mg Xanthin/dl).

Im folgenden Text wird als "Oxypurine" diejenige Harnsäuremenge bezeichnet, die durch Zusatz von XOD aus Hypoxanthin und Xanthin entstand.

Bei der Oxydation von Xanthin und Hypoxanthin durch XOD entsteht nach folgender Reaktion als Nebenprodukt H_2O_2 :



Da H_2O_2 eine sehr aggressive oxydierende Wirkung hat und auch die Harnsäure zerstört, muß KAT (Katalase) zugesetzt werden, die H_2O_2 nach folgender Gleichung zersetzt:



Es befinden sich bei diesem Enzymtest somit drei Enzyme in einem Ansatz.

Diese Methode wurde von Klinenberg et al. (22) eingeführt. Bei Anwendung der Originalmethode müssen mehrfach sehr kleine Mengen pipettiert werden, wobei in Proben- und Referenzküvette unterschiedliche Volumina zustande kommen, die bei der Berechnung korrigiert werden. Wir haben deshalb die Volumina dieses Tests der Harnsäurebestimmung nach Zöllner (46) angepaßt, wodurch sowohl Arbeitsweise als auch Berechnung der Ergebnisse wesentlich vereinfacht werden.

Lösungen wurden in der unter Abschnitt 3.2.5.1. beschriebenen Form verwendet.

Es wurde außerdem verwendet:

Xanthinoxidase aus Kuhmilch (Boehringer Mannheim), 1 U/mg bei 25° C, Suspension in Ammoniumsulfatlösung.

Katalase aus Rinderleber (Boehringer Mannheim), 260000 U/ml bei 25° C, Lösung in Glycerin.

Die XOD/KAT-Lösung enthielt 20 µl XOD-Suspension, 10 µl Katalase-Lösung und Puffer in einem Gesamtvolumen von 1 ml.

Bei der Pipettierung der Ansätze zur Photometrie betrug der Zeitabstand zwischen Zugabe der XOD/KAT-Lösung und der Uricasegebrauchslösung 20 min. In dieser Zeitspanne ist sicher gewährleistet, daß die Oxydation von Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure vollständig abgelaufen ist. Nach 5 Minuten ist das Maximum der Extinktion bei 293 nm erreicht.

Ansätze für die Photometrie:

1.) Bestimmung des Extinktionsabfalls in der Probe mit XOD:

1 ml verdünnter Urin		1 ml verdünnten Urin
1 ml Pufferge- brauchslösung	gemessen gegen	1 ml Uricasegebrauchs- lösung
1 ml XOD/KAT-Lösung		1 ml XOD/KAT-Lösung

2.) Bestimmung des ΔE in der Probe ohne XOD:

1 ml verdünnter Urin		1 ml verdünnten Urin
2 ml Pufferge- brauchslösung	gemessen gegen	1 ml Uricasegebrauchs- lösung
		1 ml Puffergebrauchs- lösung

3.) Bestimmung der Eigenextinktion der Uricase:

1 ml Puffergebrauchs- lösung		2 ml Puffergebrauchs- lösung
1 ml XOD/KAT-Lösung	gemessen gegen	
1 ml Uricasege- brauchslösung		1 ml XOD/KAT-Lösung

Berechnung der Konzentration:

Entsprechend der zur Berechnung der Harnsäurekonzentration von Zöllner (46) aufgestellten Formel ergibt sich zur Berechnung der Oxypurinkonzentration folgende Gleichung:

Oxypurine (mg Harnsäure/dl) =

$$\frac{(E_{\text{HSox}} + E_{\text{U}}) \times 3 \times 100 \times \text{Verdünnung}}{0,0745 \times 1 \times 1000} - \frac{(E_{\text{HS}} + E_{\text{U}}) \times 3 \times 100 \times \text{Verdünnung}}{0,0745 \times 1 \times 1000}$$

(E = Extinktion, U = Uricase, HS = Harnsäure, HSox = Gesamtharnsäure nach Oxydation von Hypoxanthin und Xanthin mit Hilfe von Xanthinoxidase).

Bei Bestimmung der Gesamtharnsäure ist das XOD/KAT-Gemisch in beiden gegeneinander gemessenen Küvetten enthalten, braucht also bei der Berechnung nicht berücksichtigt zu werden. Wird der Extinktionskoeffizient der Harnsäure aufgerundet (0,075 für eine Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$), so ergibt sich daraus

$$\text{Oxypurine (mg Harnsäure/dl)} = (E_{\text{HSox}} - E_{\text{HS}}) \times 4 \times \text{Verdünnungsfaktor},$$

da die Uricase in beiden Ansätzen enthalten ist und somit bei Bildung der Differenz ihre Eigenextinktion ebenfalls entfällt.

Vor jeder Serie der Oxypurinbestimmung wurde eine Eichkurve angefertigt. Dazu wurde eine Eichlösung hergestellt, die 14 mg/dl Harnsäure und 2 mg/dl Hypoxanthin enthielt. Wie bei der Zöllner-schen Harnsäurebestimmung wurde eine Verdünnungsreihe pipettiert.

Zur Photometrie wurden folgende Ansätze hergestellt:

Bestimmung des Extinktionsabfalls in der Probe mit XOD:

1 ml Harnsäure/ Hypoxanthinlösung (aus der Verdünnungsreihe)	1 ml Harnsäure/Hypoxanthin- lösung (aus der Verdünnungsreihe)
gemessen gegen	
1 ml XOD/KAT-Gemisch	1 ml Puffergebrauchslösung
1 ml Uricasegebrauchslösung	1 ml XOD/KAT-Gemisch

Bei obigem Ansatz wurde wie bei der Oxypurinbestimmung im Urin zuerst zur Harnsäure/Hypoxanthinlösung das XOD/KAT-Gemisch pipettiert. In einem Abstand von 20 min dann die Uricasegebrauchslösung. Abbildung 5 zeigt ein Beispiel der Eichkurve.

Eine andere Art von Eichkurve wurde zum Einüben der Methode erstellt. Es handelt sich dabei um eine Differenzeneichkurve. Wie oben wurde dazu eine Verdünnungsreihe hergestellt. Anschließend wurde erst die Harnsäure ohne XOD/KAT-Gemisch gemessen.

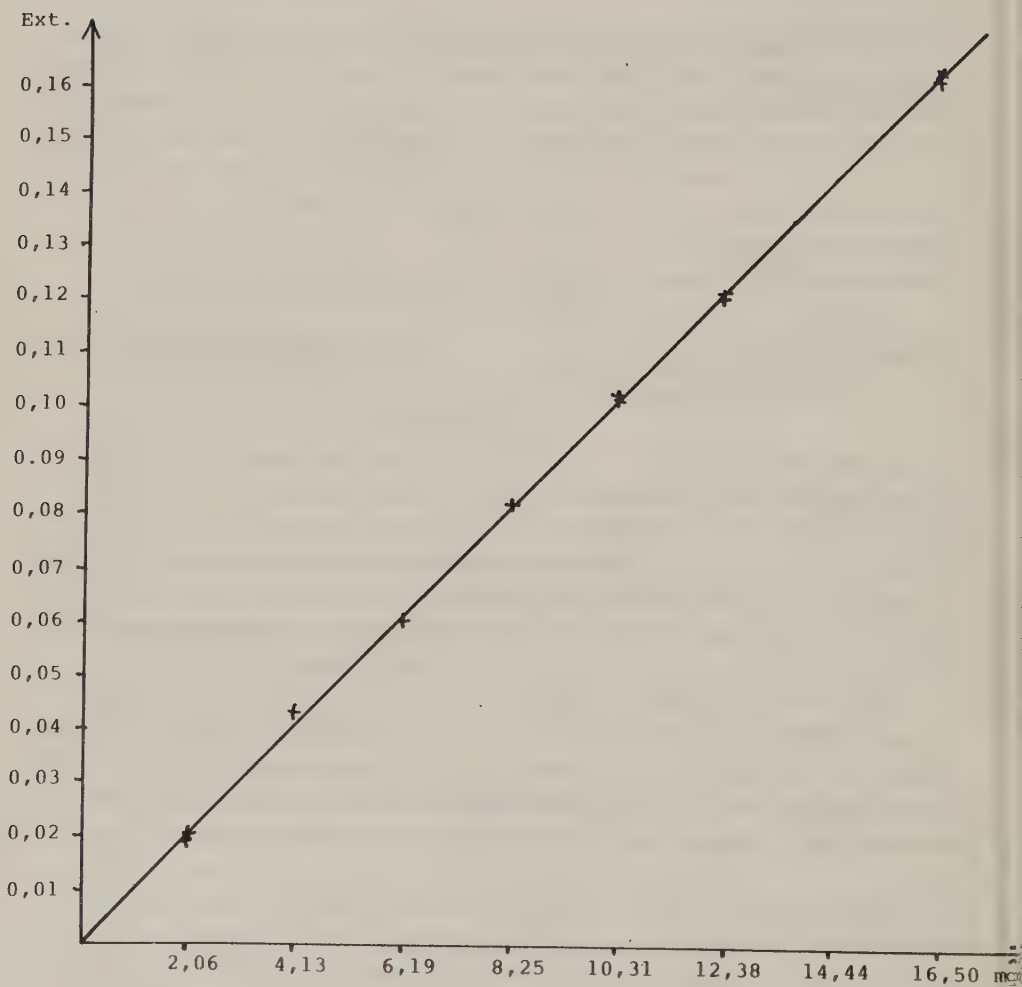


Abb. 5: Eichkurve der Gesamtharnsäurebestimmung. Die Stammlösung enthielt 14 mg/dl Harnsäure und 2 mg/dl Hypoxanthin.

Ansätze zur Photometrie:

Bestimmung des Extinktionsabfalls in der Probe (Eichlösung) ohne XOD:

1 ml Eichlösung	1 ml Eichlösung
1 ml Puffergebrauchslösung	gemessen gegen
1 ml Uricasegebrauchslösung	2 x 1 ml Puffergebrauchslösung

Die zweite Messung entsprach den Messungen der zuerst beschriebenen Eichkurve.

Aus den Werten wurden dann die Differenzen errechnet und die Eichkurve gezeichnet (Abbildung 6). Wegen des hohen Arbeitsaufwandes ist diese Methode aber für Routinebestimmungen nicht geeignet.

Es zeigt sich in der Praxis, daß die oben beschriebene Methode der Oxypurinbestimmung zu fehlerhaften Ergebnissen führte. Zur Klärung der Ursache dieser Fehler wurden Untersuchungen zum Einfluß der Eigenextinktion der Uricase auf die Genauigkeit der Methode sowie zur Definition des methodischen Fehlers der Oxypurinbestimmung durchgeführt.

Zum Einfluß der Eigenextinktion der Uricase auf die Genauigkeit der Methode wurden zuerst die Eigenextinktionswerte aller Bestimmungsreihen der Oxypurine betrachtet. Außerdem wurden die Eigenextinktionswerte nach Beendigung der Bestimmungsreihen nachgemessen, um Änderungen der Extinktion im XOD/KAT/Uricase-Gemisch zu erkennen. Dazu wurde auch eine Zeitkurve über drei Stunden angefertigt.

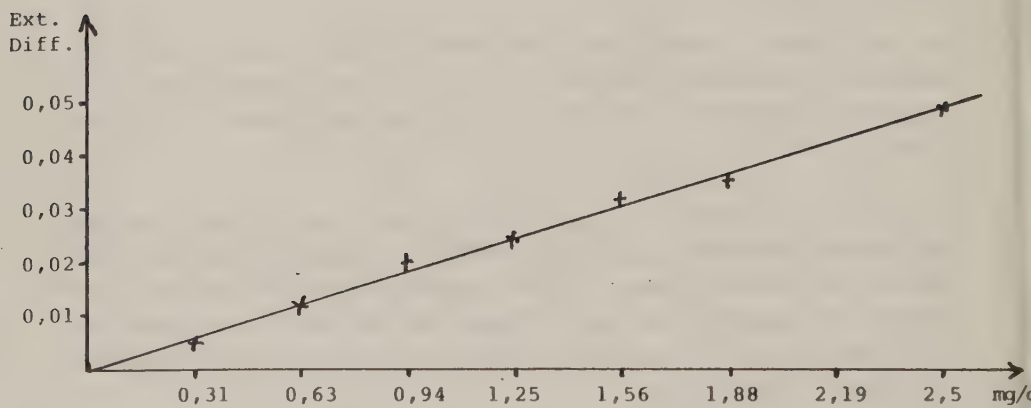


Abb. 6: Differenzeneichkurve der Oxypurinbestimmung (siehe Seite 28 und

Zur Definition des methodischen Fehlers der Oxypurinbestimmung wurden in mehreren Urinen je neunmal die Oxypurinkonzentration gemessen und die Schwankungsbreiten statistisch bestimmt. Verglichen wurde außerdem die normale Zöllnersche Harnsäurebestimmungsmethode mit der etwas abgewandelten Methode (1 ml Probe anstatt 2 ml) für die Oxypurinbestimmung.

3.2.5.3. Harnsäureisolierung

Zur Isolierung der Harnsäure aus dem Urin wurde die Methode von Johnson und Emmerson (20) verwendet. Dabei wurde der 12- oder 24-h-Urin mit 4M NH_4Cl auf pH 10 mit Hilfe von Universalindikatorpapier (Merck, Darmstadt) eingestellt und 5 g Kieselgel (Merck, Darmstadt) zugefügt. Nach 15 Minuten wurden die ausgefallenen Phosphate unter Vakuum mit einer großen Porzellanfilternutsche abgesaugt. Das Filtrat wurde mit Eisessig auf pH 7,5 eingestellt und auf eine Anionenaustauschersäule aufgetragen (Dowex 2x8, Bio-Rad). Die Größe der Säule betrug 40 x 2 cm, die Fließgeschwindigkeit 3 - 5 ml/min. Nach Waschen mit 800 ml Aqua dest. erfolgte die Elution der Harnsäure mit 1000 ml 0,5 M Pyridin-Formiatlösung pH 4,0 (0,5 Mol Pyridin, 0,5 Mol Ameisensäure, Aqua dest ad. 1000 ml, pH-Einstellung mit konzentrierter Ameisensäure). Diesem Eluat wurde 10 ml 5%ige Natriumsulfit-Hydrazinhydratlösung zugesetzt, um die Oxydation der Harnsäure zu verhindern. Anschließend erfolgte die Einengung mit einem Rotationsverdampfer unter vorsichtigem Erwärmen im Wasserstrahlvakuum auf ca. 5 ml. Dieses Konzentrat wurde dann mit ca. 40 ml Aqua dest. versetzt und auf 4° C gekühlt. Die Harnsäure fällt dabei kristallin aus.

Die Kristalle wurden nun in einem Glasfiltertigel unter Vakuum abgesaugt und in 30 - 40 ml 0,8%igem Li_2CO_3 gelöst. Die mit Aktivkohle (Merck, Darmstadt) versetzte Lösung wurde filtriert, die Harnsäure dann aus dem Filtrat mit 2N Essigsäure bei 4° - 10° C ausgefällt und die Kristalle im Glasfiltertigel abgesaugt. Dieser Reinigungsvorgang wurde einmal wiederholt.

Zur Reinheitsbestimmung wurde eine Lösung photometriert, die die isolierte und getrocknete Harnsäure in einer Konzentration von 1 mg/ml enthielt. Die Extinktion betrug 0,074, der theoretisch zu erwartende Wert 0,0745. Die Reinheit wurde außerdem mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie überprüft, wobei außer Harnsäure keine im UV-Bereich absorbierenden Substanzen nachgewiesen werden konnten. Ein Spektrum dieser Untersuchung ist in Abbildung 7 dargestellt. *

Die Regeneration des Isonenaustauscherharzes erfolgte durch Aufschwemmung in 1 n NaOH, mehrfaches Waschen mit Aqua dest., Aufschwemmung in 1 n Essigsäure, erneutes Waschen mit Aqua dest. und schließlich Aufschwemmung in Eisessig und Waschen mit Aqua dest. bis zu einem pH von über 4,0.

3.2.5.4. Harnsäureaufschluß zur massenspektrometrischen ^{15}N - und ^{13}C -Bestimmung

Zur ^{15}N -Bestimmung wurde die Harnsäure nach einem abgewandelten Kjeldahl-Verfahren aufgeschlossen (Abbildung 8). Dazu wurden zu 2 - 3 mg Harnsäure, 400 μl konz. H_2SO_4 (Schwefelsäure zur Stickstoffbestimmung; Merck, Darmstadt) und eine Spatelspitze Selenoxydationsgemisch nach Wieninger (Merck, Darmstadt) gegeben. Die Reagenzgläser mit diesem Gemisch wurden im Metallblock 8 h bei 350°C am Rückflußkühler gekocht. Nachdem die Reagenzgläser abgekühlt waren, wurden 5 μl Bromkresolgrün (0,1%ig; Merck, Darmstadt) zugesetzt und die Lösung auf Eis bis zum Umschlag des Indikators mit konzentrierter NaOH alkalisiert. Danach wurde das Glas sofort mit einem Gummistopfen, der ein kleines Einhängegefäß mit 200 μl HCl 0,4 n und 5 μl Bromkresolgrün enthielt, verschlossen und 12 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dabei diffundierte das entstehende NH_3 in die HCl-Lösung, und es bildete sich NH_4Cl (Abbildung 8). Nach Überführen in ein 1,5 ml fassendes

*Für diese Untersuchung habe ich Herrn Dr. S. Reiter zu danken.

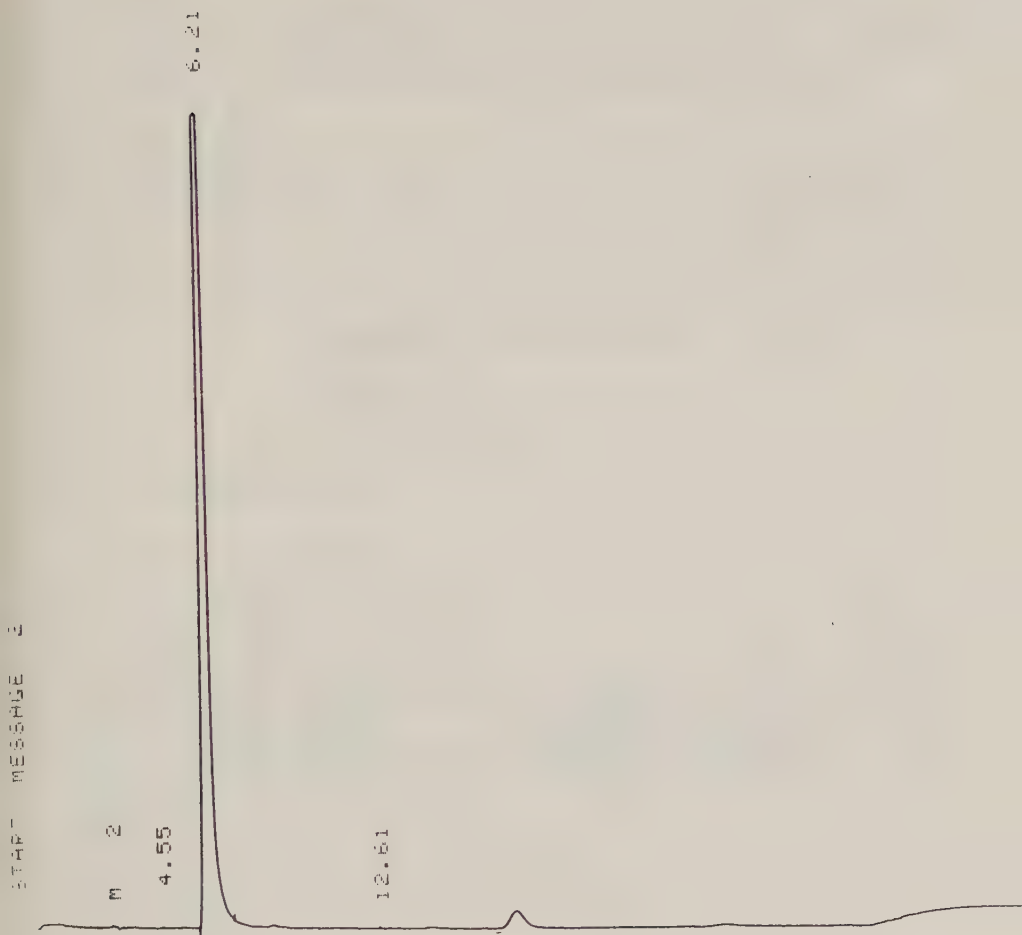
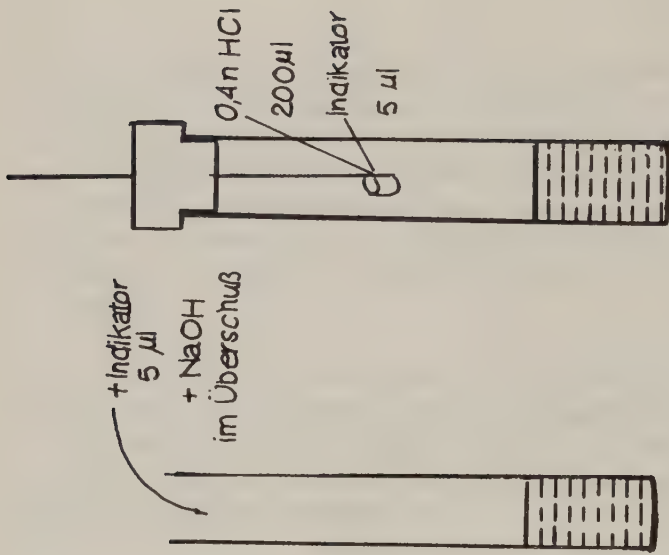
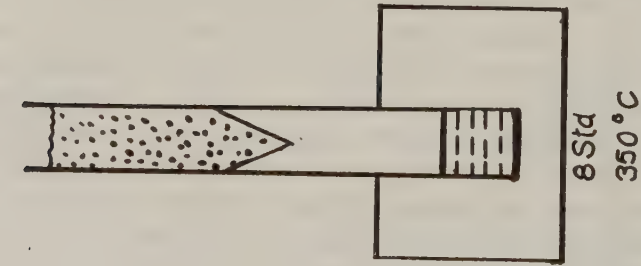


Abb. 7: HPLC-Spektrum der isolierten und gereinigten Urinharnsäure



Diffusion des NH_3 in
die HCl
(12 Std bei Zimmertemperatur)



Probe ~ 4 mg
Selenoxidationsgemisch
konz. H_2SO_4 400 µl

Abb. 8: Schematische Darstellung des abgewandelten Kjeldahl-Verfahrens zur ^{15}N -Bestimmung in der Harnsäure

Plastikgefäß (Eppendorf) wurde die Lösung im Trockenschrank bei ca. 80° C eingedampft. Zur massenspektrometrischen Bestimmung des ^{15}N -Gehalts wurde dieses Gefäß mittels Gummiringen vakuumdicht mit dem Massenspektrometer verbunden, das System evakuiert und durch Hypobromidoxydation molekularer Stickstoff freigesetzt.

Zur Bestimmung des ^{13}C -Gehalts wurde die gereinigte Harnsäure in einem mit dem Massenspektrometer gekoppelten Elementaranalysegerät im Helium-Sauerstoffstrom bei 800° C aufgeschlossen, H_2O in einem Absorptionsrohr an P_4O_{10} /Bimsstein gebunden und CO_2 in einer Kühlfalle mit flüssigem Stickstoff kondensiert. Nach Evakuierung des Systems wurde CO_2 ins Massenspektrometer expandiert (42). *

3.2.5.5. Berechnung von Poolgröße, Umsatz und endogener Synthese der Harnsäure

Poolgröße und Umsatzrate wurden nach dem Isotopenverdünnungsprinzip mit ^{13}C -markierter Harnsäure bestimmt (2). Die i.v. injizierte markierte Harnsäure vermischt sich mit der im Pool vorhandenen Harnsäure. Durch den Zufluß nicht markierter Harnsäure nimmt der Isotopengehalt des Pools ständig ab. Man mißt nun den Isotopengehalt der Urinharnsäure, die die gleiche Isotopenkonzentration wie der Pool besitzt und kann den Konzentrationsabfall zeichnerisch darstellen. Wählt man die Versuchsbedingungen so, daß Poolgröße und Umsatzrate konstant sind, ergibt die Auftragung des natürlichen Logarithmus der Isotopenkonzentration der Urinharnsäure gegen die Zeit eine Gerade mit der Steigung k.

* Für die massenspektrometrischen Messungen habe ich Herrn Dr. R. Medina, Lehrstuhl für Allgemeine Chemie und Biochemie der Technischen Universität München, Freising-Weihenstephan, zu danken.

$$k = - \frac{\ln I_1 - \ln I_2}{t_2 - t_1}$$

Durch Rückwärtsextrapolation auf t_0 kann die anfängliche Isotopenkonzentration I_0 im Pool bestimmt werden.

Wird $\ln I_0$ für $\ln I_1$ und die Konzentration 1 für I_2 ($\ln 1 = 0$) gesetzt, so erhält man als einfachste Form der Gleichung

$$k = - \frac{\ln I_0}{t}$$

wobei t diejenige Zeit ist, zu der die Gerade die x-Achse schneidet.

Ist die Isotopenkonzentration im Pool zu einer beliebigen Zeit t

$$I_t = I_0 \cdot e^{-kt}$$

so ist

$$\ln I_t = \ln I_0 - kt.$$

Setzt man wieder für I_t die Konzentration 1 ein, so erhält man

$$k = \frac{\ln I_0}{t}$$

Die Größe k mit der Einheit Tage⁻¹ gibt also an, um welchen Teil sich die Isotopenkonzentration im Pool pro Zeiteinheit ändert, d.h., k ist ein Maß für die Ganzkörperclearance der Harnsäure.

Die Poolgröße wird nach dem Verdünnungsprinzip berechnet:

$$a \times I_i = (A + a) \times I_o$$

a = injizierte Harnsäuremenge

I_i = Isotopenkonzentration der injizierten Harnsäure

A = Harnsäurepool

I_o = Isotopenkonzentration der Harnsäure im Pool unmittelbar nach vollständiger Durchmischung mit der injizierten Harnsäure.

Der Harnsäurepool hat demnach die Größe

$$A = a \frac{I_i}{I_o} - a$$

Das Produkt aus A (mg) und k (Tage⁻¹) gibt dann den Harnsäureumsatz als Menge pro Zeit an:

$$\text{Harnsäureumsatz (mg/Tag)} = A \times k$$

Die endogene Synthese wurde mit Hilfe des Einbaus von ¹⁵N-Glycin in die Harnsäure bestimmt. Wird der nach dem Isotopenverdünnungsprinzip ermittelte Harnsäureumsatz mit der ¹⁵N-Konzentration der Harnsäure multipliziert, so erhält man die in Form von Harnsäure ausgeschiedene Isotopenmenge.

Prinzipiell können bei Isotopeneinbaustudien Rückschlüsse sowohl aus der erreichten Isotopenkonzentration als auch aus der kumulativen Ausscheidung gezogen werden. Wegen der Verdünnung durch exogene Harnsäure war in unserem Fall die ¹⁵N-Konzentration der Harnsäure allein nicht verwertbar.

3.3. Ergebnisse

3.3.1. Harnsäurewerte

Die Harnsäurebestimmungen erfolgten unter Normalkost, unter purinfreier Formeldiät allein sowie unter Formeldiät mit Zulage von Purinnukleotiden. Die Werte der Versuchsperson K.M. sind in den Tabellen 3 (Vorperiode unter Normalkost), 4 (erste Formeldiätperiode, purinfrei), 5 (Zwischenphase unter Normalkost), 6 (zweite Formeldiätperiode mit Purinzulage) und 7 (Nachphase unter Normalkost) aufgeführt. In Abbildung 9 sind sämtliche Harnsäurewerte des Versuchs graphisch dargestellt.

Unter Normalkost betrugen die Mittelwerte der Plasmaharnsäure $5,5 \pm 0,5$ mg/dl * (n = 16; Zwischenphase) und $5,8 \pm 0,4$ mg/dl (n = 16; Nachphase), die Mittelwerte der Urinharnsäure 670 ± 98 mg/24 h (n = 8; Zwischenphase) und 594 ± 79 mg/24 h (n = 8; Nachphase). Die aus den 24 h-Ausscheidungen errechnete Harnsäureclearance betrug $8,5 \pm 1,5$ ml/min (Zwischenphase) und $7,2 \pm 1,2$ ml/min (Nachphase).

Unter Formeldiät allein fielen Plasma- und Urinharnsäure erwartungsgemäß ab. Im steady state betrugen der Mittelwert der Plasmaharnsäure $3,2 \pm 0,4$ mg/dl (n = 10), der Mittelwert der Urinharnsäure 328 ± 17 mg/24 h (n = 10).

* Die Angabe von Zahlen in der Form $a \pm b$ (Dimension) stellt den Mittelwert mit Standardabweichung dar, sofern nicht anders angegeben.

Unter Nukleotidzulage zur Formeldiät lagen die Harnsäurewerte über den Werten unter Normalkost. Im steady state betrugen der Mittelwert der Plasmaharnsäure $7,1 \pm 0,3$ mg/dl ($n = 8$), der Mittelwert der Urinharnsäure 970 ± 50 mg/24 h ($n = 11$).

Die niedrigeren Werte unter Formeldiät gingen mit einer verminderten, die Werte unter Nukleotidzulage mit einer erhöhten renalen Harnsäureclearance im Vergleich zur Normalkost einher. Sie betrugen 7,2 ml/min (purinfrei) bzw. 9,5 ml/min (mit Purinzulage) und $8,5 \pm 1,3$ ml/min (Normalkost, Zwischenphase).

Datum	Urin ml/24h	HS mg%	HS mg/24h
30.1.81	1640	41,0	661
4.2.81	1500	42,0	634
6.2.81	1850	35,8	664
9.2.81	1820	30,9	562

Tab. 3: Renale Harnsäureausscheidung während der Vorperiode unter
Normalkost

Datum	Nr.	Urin ml/24h *ml/12h	pH	HS Urin mg/dl	HS Urin mg/24h	HS Urin mg/12h	HS Plasma mg/dl
11.2.81	1	840	6,0	63,3	532	-	4,9
12.2.81	2	830	6,0	45,3	376	-	-
13.2.81	3	740	6,0	43,0	319	-	3,6
14.2.81	4	1200	6,0	27,1	325	-	-
15.2.81	5	1070	6,0	29,5	315	-	3,6
16.2.81	6	1165	7,0	30,2	352	-	-
17.2.81	7	1200	6,5	27,8	334	-	3,7
18.2.81	8	1420	6,5	22,2	315	-	-
19.2.81	9	1125	6,5	29,8	336	-	3,2
20.2.81	10	1140	6,5	27,9	319	-	2,6
21.2.81	11a	*758	7,0	35,4	428	278	3,3 vor Inj.
							3,8 nach Inj.
	11b	*380	6,0	39,5		150	3,0 abends
22.2.81	12a	*645	6,0	29,6	326	191	3,3
	12b	*315	6,0	42,9		135	-
23.2.81	13a	*650	6,0	33,2	339	216	3,1
	13b	*360	6,0	34,2		123	-
24.2.81	14a	*740	6,5	30,2	345	224	3,4
	14b	*440	6,5	27,7		122	-
25.2.81	15a	*945	7,0	22,7	352	214	2,7
	15b	*500	6,0	27,5		138	-
26.2.81	16a	*595	6,0	35,2	349	210	2,7
	16b	*360	6,0	38,9		140	-
27.2.81	17	1400	6,0	22,4	314	-	-
28.2.81	18	1500	6,5	21,4	321	-	3,4
1.3.81	19	900	6,0	34,6	312	-	-
2.3.81	20	1420	6,0	21,9	311	-	3,3
3.3.81	21	990	6,0	31,7	314	-	-
4.3.81	22	-	-	-	-	-	3,6

Tab. 4: Harnsäurewerte der Urine und Plasmen (1. Diätphase-purin-frei)

Datum	Nr.	Urin ml/24h	pH	HS Urin mg/dl	HS Urin mg/24h	HS Plasma mg/dl	HS-Clearance ml/min
6.3.81	23a					4,1	
		1300	6,5	53,1	690		9,9
7.3.81	23b					5,6	
15.3.81	24a					5,7	
		1540	6,5	50,6	779		9,7
16.3.81	24b					5,4	
17.3.81	25a					5,5	
		830	7,0	72,0	597		7,8
18.3.81	25b					5,2	
20.3.81	26a					5,8	
		1320	6,0	45,3	598		7,5
21.3.81	26b					5,3	
27.3.81	27a					5,7	
		1080	7,0	78,5	848		10,5
28.3.81	27b					5,5	
3.4.81	28a					5,7	
		1280	6,5	51,6	660		8,0
4.4.81	28b					5,8	
14.4.81	29a					6,0	
		870	6,5	65,9	574		6,8
15.4.81	29b					5,7	
28.4.81	30a					5,2	
		1660	7,0	37,0	614		8,0
29.4.81	30b					5,5	

Tab. 5: Harnsäurewerte der Urine und Plasmen (Zwischenphase unter Normalkost)

Datum	Nr.	Urin ml/24h *ml/12h	pH	HS Urin mg/dl	HS Urin mg/24h	HS Urin mg/12h	HS Plasma mg/dl
6.5.81	1	1420	6,0	55,4	786	-	5,2
7.5.81	2	1310	6,0	67,2	880	-	-
8.5.81	3	1250	6,5	77,5	969	-	6,6
9.5.81	4	1100	7,0	78,8	887	-	-
10.5.81	5	1180	7,0	74,5	879	-	6,8
11.5.81	6	1460	5,5	67,5	985	-	-
12.5.81	7	1260	6,5	76,5	964	-	6,7
13.5.81	8	1680	6,5	56,1	925	-	-
14.5.81	9	1180	6,5	85,3	1007	-	7,3
15.5.81	10	1380	6,5	71,5	986	-	6,8
16.5.81	11a	*1040	7,0	64,2	1017	667	6,9 vor Inj.
						350	7,9 nach Inj.
	11b	* 365	6,0	95,9	886	587	7,6 abends
17.5.81	12a	*1050	6,0	55,9		300	7,2
	12b	* 320	5,5	93,6	962	592	-
18.5.81	13a	* 740	7,0	80,0		370	7,3
	13b	* 340	6,0	108,7	936	614	-
19.5.81	14a	*1020	7,0	60,2		323	7,4
	14b	* 320	6,5	100,9	973	599	-
20.5.81	15a	* 620	6,5	96,6		374	6,9
	15b	* 340	6,0	110,0	997	625	-
21.5.81	16a	*1260	6,5	49,6		372	7,1
	16b	* 320	6,0	116,3	995	-	-
22.5.81	17	1080	6,5	92,1		-	-
23.5.81	18	1230	6,5	85,8	1056	-	6,6
24.5.81	19	1260	7,0	77,5	977	-	-
25.5.81	20	1260	6,5	77,8	980	-	7,5
26.5.81	21	1150	6,5	78,0	897	-	-
27.5.81	22	-	-	-	-	-	6,8

Tab. 6: Harnsäurewerte der Urine und Plasmen (2. Diätphase-Purin-
zulage)

Datum	Nr.	Urin ml/24h	pH	HS Urin mg/dl	HS Urin mg/24h	HS Plasma mg/dl	HS-Clearance ml/min
1.6.81	23a					5,7	
		850	7,0	81,5	693		9,0
2.6.81	23b					5,0	
4.6.81	24a					5,6	
		960	6,5	65,4	628		7,9
5.6.81	24b					5,4	
8.6.81	25a					6,0	
		1110	6,0	51,3	570		6,4
9.6.81	25b					6,4	
11.6.81	26a					5,8	
		1200	6,5	56,4	677		8,3
12.6.81	26b					5,5	
22.6.81	27a					5,8	
		1280	6,5	46,8	599		7,2
23.6.81	27b					6,0	
2.7.81	28a					5,4	
		920	6,5	52,4	482		6,1
3.7.81	28b					5,5	
16.7.81	29a					6,0	
		1440	6,5	43,0	620		6,8
17.7.81	29b					6,7	
30.7.81	30a					5,7	
		1750	6,0	27,7	485		5,7
31.7.81	30b					6,1	

Tab. 7: Harnsäurewerte der Urine und Plasmen (Nachphase unter Normalkost)

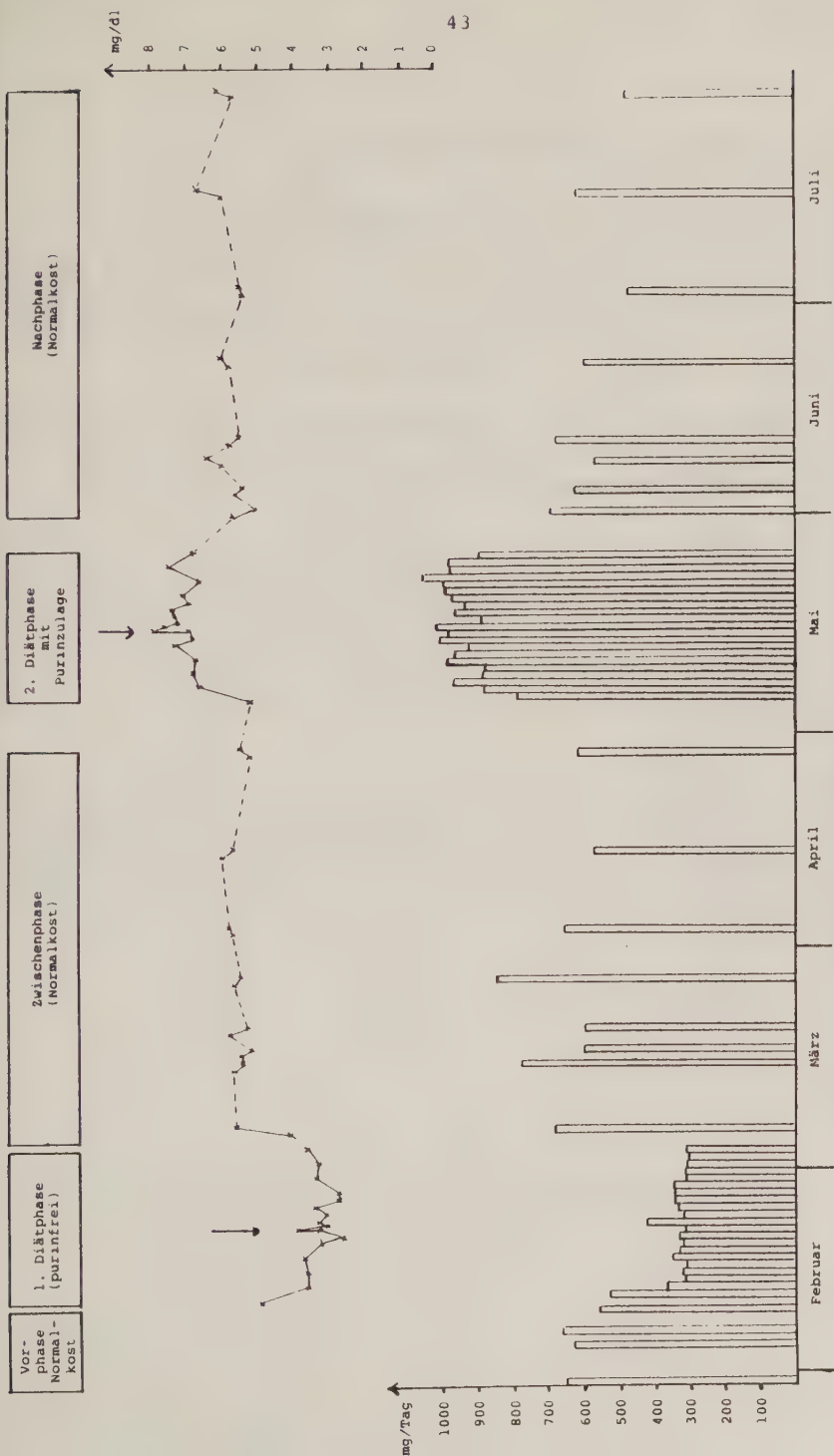


Abb. 9: Plasmaharnsäure und renale Harnsäureausscheidung der Versuchsperson K.M. unter Normalkost, purinfreier Formeldiät sowie einer Zulage von AMP und GMP zur Formeldiät. Die Zeitpunkte der Isotopenzufuhr sind mit $\downarrow$ gekennzeichnet. Die Zeitpunkte der Blutentnahmen und Urinsammelperioden gehen aus den Tabellen 3-7 hervor.

3.3.2. Poolgröße und Umsatz der Harnsäure

Die Größe und der Umsatz des Harnsäure-Pools wurden unter purinfreier Formeldiät und unter Formeldiät mit Zulage von Purinnukleotiden bestimmt (Tabelle 10). Die Werte des fraktionellen Umsatzes wurden in Abbildung 10 graphisch ermittelt. Die Isotopenwerte befinden sich in den Tabellen 8 und 9.

Der fraktionelle Umsatz des Harnsäure-Pools, die Konstante k , stieg bei der Versuchsperson B.G. unter Purinzulage von 0,52 auf 0,80/Tag, bei der Versuchsperson K.M. von 0,63 auf 0,88/Tag.

Die Poolgröße betrug unter purinfreier Kost bei der Versuchsperson B.G. 805 mg, unter Purinzulage vergrößerte sich der Pool auf 1477 mg. Bei der Versuchsperson K.M. lagen die Poolgrößen bei 732 und 2116 mg. Der Harnsäureumsatz betrug bei der Versuchsperson B.G. 419 und 1182, bei der Versuchsperson K.M. 461 und 1862 mg/Tag.

Unter purinfreier Kost schied die weibliche Versuchsperson B.G. 58%, unter Purinzulage 72% des Umsatzes renal aus. Die männliche Versuchsperson K.M. hatte dagegen unter purinfreier Diät eine renale Harnsäure-Ausscheidung von 71%, bei Purinzulage von 52% des Umsatzes.

Proben- nummer	Atom% ^{13}C		
8	1,075	1,077 = 0-Wert	
9	1,079		
		Atom% Über- schuß	ln Atom% Über schuß
11a	2,987	1,910	0,647
11b	2,768	1,691	0,525
12a	2,409	1,332	0,287
12b	2,041	0,964	-0,037
13a	1,733	0,656	-0,422
13b	1,529	0,451	-0,795
14a	1,561	0,484	-0,727
14b	1,346	0,268	-1,316
15a	1,253	0,175	-1,741
15b	1,208	0,131	-2,031
16a	1,173	0,096	-2,342
16b	1,156	0,079	-2,543
17	1,129	0,051	-2,970
18	1,109	0,032	-3,442
19	1,097	0,020	-3,912
20	1,087	0,010	-4,605
21	1,076	0,000	

Tab. 8: ^{13}C -Werte der 1. Diätphase der Versuchsperson K.M.
Numerierung der Proben vgl. Tab. 4.

Proben- nummer	Atom% ^{13}C
8	1,090
9	1,089
	1,090

		Atom% Über- schuß	ln Atom% Über- schuß
11a	1,900	0,810	-0,211
11b	1,481	0,328	-1,115
12a	1,299	0,209	-1,565
12b	1,316	0,226	-1,487
13a	1,234	0,144	-1,938
13b	1,227	0,137	-1,988
14a	1,169	0,079	-2,538
14b	1,142	0,052	-2,957
15a	1,115	0,025	-3,689
15b	1,106	0,016	-4,135
16a	1,095	0,005	-5,298
16b	1,090	0,000	

Tab. 9: ^{13}C -Werte der 2. Diätphase der Versuchsperson K.M.
Numerierung der Proben vgl. Tab. 6.

Probanden	injizierte Harnsäure (mg)	I_i Atom-% ¹³ C der injizierten Harnsäure	I_o Atom-% ¹³ C Über- schuß zur Zeit $t = 0$	Umsatz- rate k $\left(\frac{1}{\text{Tag}}\right)$	Pool A (mg)	Umsatz A x k (mg/Tag)	renale HS- Ausscheidung $U \times V$ (mg/Tag)	$\frac{U \times V}{A \times k} \times 100$ (%)	enterale HS- Ausscheidung (mg)	(%)
I S. M.	108,7	18,89	2,25	0,52	805	419	242	58	177	42
	125,8	18,89	2,77	0,63	732	461	328	71	133	29
II G. M.	106,6	18,89	1,27	0,80	1477	1182	850	72	332	28
	118,3	18,89	1,00	0,88	2116	1862	971	52	891	48

b. 10: Größe und Umsatz des Harnsäure-Pools, renale und enterale Harnsäure-Ausscheidung beider Versuchspersonen

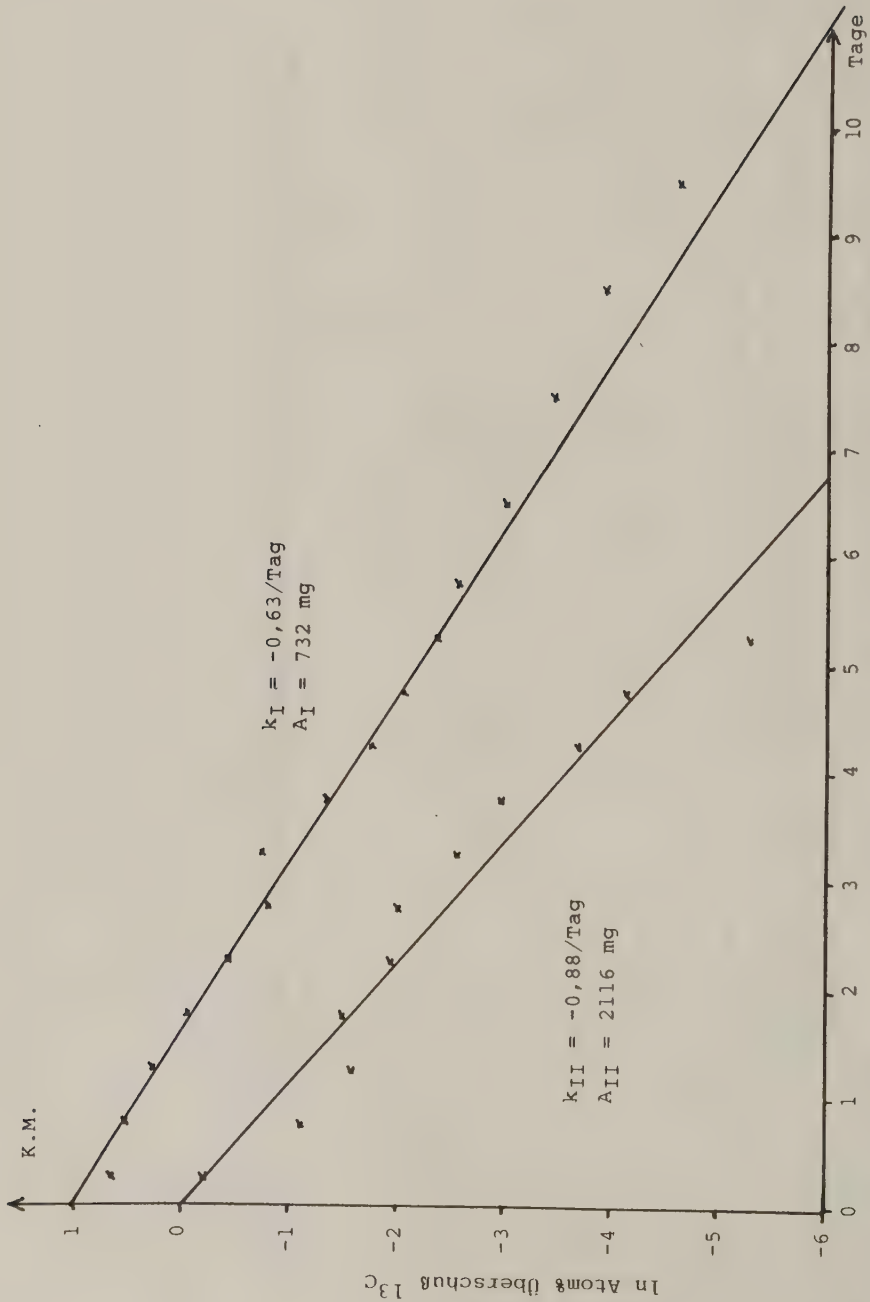


Abb. 10: Halblogarithmische Darstellung der Isotopenkonzentration der Urinharnsäure der Versuchsperson K.M. nach Injektion ^{13}C -markierter Harnsäure. k_I Umsatzrate unter

3.3.3. Endogene Harnsäurebildung

Die Versuchsperson K.M. schied in der 1. Diätphase im Mittel 0,1024 mg ^{15}N pro Tag als Urinharnsäure aus. Nach den Bestimmungen von Pool und Umsatz waren dies 71% der Gesamtausscheidung. Die ^{15}N -Gesamtausscheidung betrug somit $0,1024 \times \frac{100}{71} = 0,1442$ mg/Tag. Über 11 Tage summiert entspricht dies $\frac{0,1442 \times 11}{724,33} = 0,219\%$ des in Form von Glycin verabreichten ^{15}N .

In der 2. Diätphase ergab sich für dieselbe Versuchsperson im Mittel eine ^{15}N -Ausscheidung als Urinharnsäure von 0,0878 mg/Tag. Die Gesamtausscheidung betrug $0,0878 \times \frac{100}{52} = 0,1688$ mg/Tag im Mittel. Dies entspricht 0,256% der zugeführten Dosis in 11 Tagen. Die Einzelwerte der Versuchsperson K.M. sind in den Tabellen 11 bis 14 aufgeführt und in Abbildung 11 graphisch dargestellt.

Bei der Versuchsperson B.G. betrug in der 1. Diätphase die mittlere tägliche renale ^{15}N -Ausscheidung 0,0956 mg/Tag. Dies entspricht einer Gesamtausscheidung von $0,0956 \times \frac{100}{58} = 0,1648$ mg/Tag, $\frac{0,1648 \times 11}{619,64} = 0,293\%$ der zugeführten Dosis in 11 Tagen.

In der 2. Diätphase schied die Versuchsperson B.G. im Mittel 0,1120 mg ^{15}N /Tag als Urinharnsäure aus. Daraus ergibt sich eine Gesamtausscheidung von durchschnittlich $0,1120 \times \frac{100}{72} = 0,1556$ mg/Tag. In 11 Tagen entspricht dies 0,276% der zugeführten Dosis. Die Werte der Versuchsperson B.G. sind in den Tabellen 15 und 16 aufgeführt.

Nr.	Atom% ¹⁵ N	Atom% ¹⁵ N schuß der Harnsäure	HS(mg/24h) (*mg/12h)	mgHS-N/ 12 oder 24h	mg ¹⁵ N ausge- schieden als Urinharnsäure	mg ¹⁵ N Gesamtausscheidung = $\frac{100}{71}$ x renale Ausscheidung
8	0,359	0,361 = 0-Wert	*278	92,53	0,0291	0,0409
9	0,364		*150	50,07	0,0514	0,0724
			*191	63,57	0,0447	0,0629
			*135	45,07	0,0449	0,0627
			*216	71,97	0,0492	0,0693
			*123	41,07	0,0422	0,0594
			*224	74,50	0,1177	0,1658
			*122	40,60	0,0014	0,0020
			*214	71,37	0,0714	0,1006
			*138	45,93	0,0468	0,0659
			*210	69,87	0,0514	0,0724
			*140	46,63	0,0482	0,0679
			314	104,53	0,1049	0,1477
			321	106,97	0,1095	0,1542
			312	103,83	0,1064	0,1499
			311	103,63	0,1012	0,1425
			314	104,63	0,1061	0,1494
11a	0,393	0,031				
11b	0,464	0,103				
12a	0,432	0,070				
12b	0,461	0,100				
13a	0,430	0,068				
13b	0,464	0,103				
14a	0,519	0,158				
14b	0,365	0,003				
15a	0,461	0,100				
15b	0,463	0,102				
16a	0,435	0,074				
16b	0,465	0,103				
17	0,462	0,100				
18	0,464	0,102				
19	0,464	0,103				
20	0,459	0,098				
21	0,463	0,101				

Tab. 11: ¹⁵N-Anreicherung der Urinharnsäure in der 1. Diätphase, Versuchsperson K.M.
Numerierung siehe Tab. 4

Nr.	Atom ¹⁵ N	Atom ¹⁵ N schuß der Harnsäure	HS(mg/24h) (*mg/12h)	mgHS-N/ 12 oder 24h	mg ¹⁵ N ausge- schieden als Urinharnsäure	mg ¹⁵ N Gesamtausscheidung $= \frac{100}{52} \times$ renale Ausschei- dung
8	0,363	0,365 = 0-Wert				
9	0,366					
11a	0,376	0,011	*667	222,47	0,0245	0,0471
11b	0,381	0,016	*350	116,63	0,0187	0,0359
12a	0,388	0,023	*587	195,57	0,0450	0,0865
12b	0,391	0,026	*300	99,87	0,0260	0,0499
13a	0,397	0,032	*592	197,40	0,0632	0,1215
13b	0,395	0,030	*370	123,23	0,0370	0,0711
14a	0,395	0,030	*614	204,50	0,0614	0,1180
14b	0,397	0,032	*323	107,63	0,0344	0,0662
15a	0,397	0,032	*599	199,73	0,0639	0,1229
15b	0,396	0,031	*374	124,63	0,0386	0,0743
16a	0,396	0,031	*625	208,23	0,0646	0,1241
16b	0,396	0,031	*372	124,03	0,0385	0,0739
17	0,395	0,030	995	331,60	0,0995	0,1913
18	0,390	0,025	1056	351,87	0,0878	0,1689
19	0,390	0,025	977	325,57	0,0878	0,1689
20	0,392	0,027	980	326,63	0,0882	0,1696
21	0,394	0,029	897	299,07	0,0867	0,1668

Tab. 12: ¹⁵N-Anreicherung der Urinharnsäure in der 2. Diätphase, Versuchsperson K.M.
Numerierung siehe Tab. 6.

Nr.	Atom% ^{15}N		Atom% Über- schuß ^{15}N	HS mg/24h	mgHS-N/ 24h	mg ^{15}N ausgeschieden als Urinharnsäure
8	0,359	} 0,361 = 0-Wert				
9	0,364					
23	0,410		0,048	690	230,10	0,1114
24	0,379		0,017	779	259,70	0,0452
25	0,384		0,022	597	199,13	0,0446
26	0,386		0,025	598	199,30	0,0496
27	0,378		0,017	848	282,67	0,0475
28	0,377		0,016	660	220,13	0,0352
29	0,372		0,011	574	191,23	0,0210
30	0,369		0,008	614	204,66	0,0158

Tab. 13: ^{15}N -Anreicherung der Urinharnsäure in der Zwischenphase unter Normalkost, Versuchsperson K.M.
Numerierung siehe Tab. 5.

Nr.	Atom% ^{15}N		Atom% Über- schuß ^{15}N	HS mg/24h	mgHS-N/ 24h	mg ^{15}N ausgeschieden als Urinharnsäure
8	0,363	} 0,365 = 0-Wert				
9	0,366					
23	0,395		0,030	693	231,03	0,0691
24	0,398		0,033	628	209,40	0,0691
25	0,390		0,025	570	189,97	0,0475
26	0,385		0,020	677	225,50	0,0449
27	0,382		0,017	599	199,73	0,0342
28	0,383		0,018	482	160,53	0,0281
29	0,363		0,000	620	206,75	0,0000
30	0,373		0,008	485	161,50	0,0131

Tab. 14: ^{15}N -Anreicherung der Urinharnsäure in der Nachphase unter Normalkost, Versuchsperson K.M.
Numerierung der Proben siehe Tab. 7.

Nr.	Atom% ^{15}N	Atom% ^{15}N Über- schuß ^{15}N der Harnsäure	HS (mg/24h) (*mg/12h)	mgHS-N/ 12 oder 24h	mg ^{15}N ausge- schieden als Urinharnsäure	mg ^{15}N Gesamtausscheidung $= \frac{100}{58} \times \text{renale Ausschei-}$ dung
8	0,362	0,361 = 0-Wert				
9	0,360					
11a	0,389	0,028	*198	65,94	0,0182	0,0314
11b	0,460	0,099	*101	33,77	0,0333	0,0574
12a	0,490	0,129	*188	62,75	0,0811	0,1398
12b	0,502	0,141	*126	42,08	0,0593	0,1023
13a	0,511	0,150	*150	49,92	0,0750	0,1293
13b	0,524	0,163	* 85	28,45	0,0462	0,0797
14a	0,462	0,101	*149	49,66	0,0503	0,0867
14b	0,520	0,158	*214	71,48	0,1132	0,1952
15a	0,495	0,133	*121	40,40	0,0539	0,0929
15b	0,558	0,197	* 73	24,25	0,0478	0,0824
16a	0,520	0,159	*161	53,66	0,0851	0,1467
16b	0,478	0,117	* 94	31,21	0,0365	0,0630
17	0,525	0,164	227	75,67	0,1241	0,2140
18	0,373	0,012	233	77,52	0,0092	0,0158
19	0,499	0,137	222	74,09	0,1017	0,1754
20	0,478	0,117	224	74,75	0,0872	0,1503
21	0,396	0,035	254	84,56	0,0295	0,0509

Tab. 15: ^{15}N -Anreicherung der Urinharnsäure in der 1. Diätphase, Versuchsperson B.G.
Numerierung siehe Tab. 4.

Nr.	Atom% ^{15}N	Atom% ^{15}N schuß ^{15}N der Harnsäure	HS (mg/24h) (*mg/12h)	mgHS-N/ 12 oder 24h	mg ^{15}N ausge- schieden als Urinharnsäure	mg ^{15}N Gesamtausscheidung = $\frac{100}{72}$ x renale Ausschei- dung
8	0,364	0,364 = 0-Wert				
9	0,364					
11a	0,381	0,017	*719	239,60	0,0400	0,0556
11b	0,393	0,029	*518	172,70	0,0494	0,0686
12a	0,400	0,036	*560	186,81	0,0663	0,0921
12b	0,400	0,036	*219	72,82	0,0259	0,0360
13a	0,411	0,047	*186	61,95	0,0292	0,0406
13b	0,410	0,046	*218	72,75	0,0335	0,0465
14a	0,404	0,040	*421	140,47	0,0558	0,0775
14b	0,406	0,042	*594	198,05	0,0834	0,1158
15a	0,401	0,037	*670	223,15	0,0819	0,1138
15b	0,402	0,038	*329	109,58	0,0420	0,0583
16a	0,403	0,039	*355	118,46	0,0460	0,0638
16b	0,398	0,034	*441	146,90	0,0504	0,0700
17	0,398	0,034	1482	494,13	0,1680	0,2333
18	0,398	0,034	528	176,04	0,0599	0,0831
19	0,397	0,033	1198	399,41	0,1314	0,1825
20	0,396	0,032	1019	339,80	0,1081	0,1501
21	0,399	0,035	1374	458,05	0,1612	0,2239

Tab. 16: ^{15}N -Anreicherung der Urinharnsäure in der 2. Diätphase, Versuchsperson B.G.

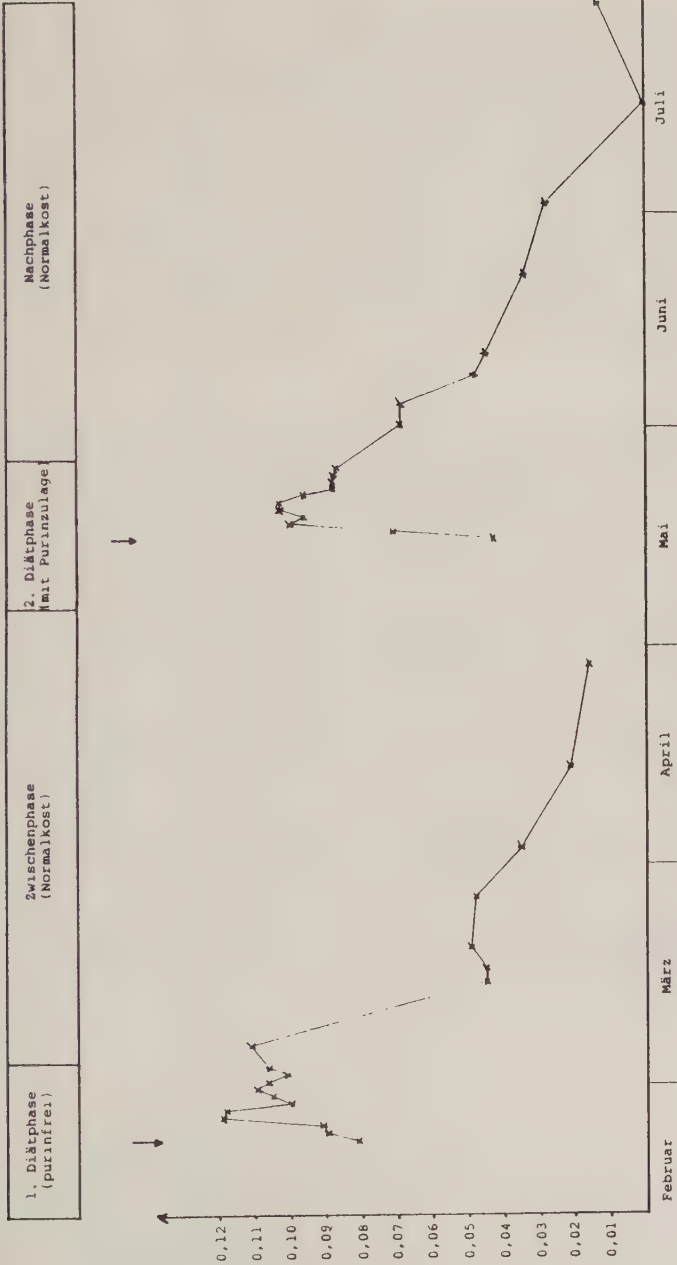


Abb. 11: mg ^{15}N ausgeschieden als Urinharnsäure während des gesamten Versuchs der Versuchsperson K.M.
Die Zeitpunkte der Isotopenzufuhr sind mit * gekennzeichnet.

3.3.4. Renale Oxypurinausscheidung

Die renale Oxypurinausscheidung lag in der 1. Diätphase (Tabelle 17) im Mittel bei $27,9 \pm 5,5$ mg/24h ($n = 11$), in der 2. Diätphase (Tabelle 18) bei $29,6 \pm 6,3$ mg/24h ($n = 11$). In der Zwischenphase unter Normalkost (Tabelle 19) lagen die Werte im Mittel bei $24,5 \pm 9,5$ mg/24h ($n = 8$), in der Nachphase (Tabelle 20), ebenfalls unter Normalkost, bei $18,8 \pm 12,5$ mg/24h. Veränderungen aufgrund der unterschiedlichen Diäten konnten somit nicht festgestellt werden.

3.3.5. Der Einfluß der Uricase-Eigenextinktion auf die Fehlerbreite der Oxypurinbestimmung; Fehlerbreite der Methode bei normaler renaler Oxypurinausscheidung

Die Eigenextinktion der Uricase wurde allein (A; 1 ml Uricasegebrauchslösung + 2 ml Puffergebrauchslösung gegen 3 ml Puffergebrauchslösung) und in Anwesenheit des XOD/KAT-Gemisches (B; 1 ml Uricasegebrauchslösung + 1 ml XOD/KAT-Lösung + 1 ml Puffergebrauchslösung gegen 1 ml XOD/KAT-Lösung + 2 ml Puffergebrauchslösung) gemessen. Bei insgesamt 20 Serien von Oxypurinbestimmungen fand sich eine Eigenextinktion (jeweils Dreifachwerte) von durchschnittlich $0,017 \pm 0,002$ (A) und $0,019 \pm 0,004$ (B), wobei die Streuung der Dreifachwerte 0,000 bis 0,001 (A) und 0,000 bis 0,006 (B) betrug. Die Eigenextinktion der Uricase in Anwesenheit von XOD/KAT (B) war maximal um 0,005 kleiner und um 0,012 größer als bei Messung ohne den Zusatz (A). Die Einzelwerte sind in Tabelle 21 aufgeführt.

Datum	Nr.	HS	HS	HSox	HSox	Ox	Ox
		mg/24h	mg/12h	mg/24h	mg/12h	mg/24h	mg/12h
11.2.81	1	516	-	551	-	35	-
12.2.81	2	380	-	407	-	27	-
13.2.81	3	335	-	363	-	28	-
14.2.81	4	311	-	349	-	38	-
15.2.81	5	304	-	333	-	29	-
16.2.81	6	350	-	383	-	33	-
17.2.81	7	338	-	369	-	31	-
18.2.81	8	318	-	347	-	29	-
19.2.81	9	360	-	394	-	34	-
20.2.81	10	327	-	357	-	30	-
21.2.81	11a	434	277	465	296	31	19
	11b		157		169		12
22.2.81	12a	328	196	360	212	32	16
	12b		132		148		16
23.2.81	13a	332	209	362	226	30	17
	13b		123		136		13
24.2.81	14a	345	224	371	240	26	16
	14b		121		131		10
25.2.81	15a	374	238	395	250	21	12
	15b		136		145		9
26.2.81	16a	348	217	368	223	20	6
	16b		131		145		14
27.2.81	17	319	-	352	-	33	-
28.2.81	18	328	-	362	-	34	-
1.3.81	19	332	-	351	-	19	-
2.3.81	20	322	-	352	-	30	-
3.3.81	21	313	-	344	-	31	-

Tab. 17: Oxyipurinwerte (gemessen als Harnsäure) der 1. Diätphase (purinfrei)

(HSox = Gesamtharnsäure nach Oxydation von Hypoxanthin und Xanthin mit Hilfe von Xanthinoxidase, Ox = Oxypurine)

Datum	Nr.	HS	HS	HSox	HSox	Ox	Ox
		mg/24h	mg/12h	mg/24h	mg/12h	mg/24h	mg/12h
6.5.81	1	765	-	797	-	32	-
7.5.81	2	808	-	847	-	39	-
8.5.81	3	934	-	982	-	48	-
9.5.81	4	836	-	875	-	39	-
10.5.81	5	852	-	885	-	33	-
11.5.81	6	963	-	1007	-	44	-
12.5.81	7	907	-	932	-	25	-
13.5.81	8	901	-	918	-	17	-
14.5.81	9	989	-	1016	-	27	-
15.5.81	10	938	-	970	-	32	-
16.5.81	11a	996	652	1030	681	34	29
	11b		344		349		5
17.5.81	12a	869	573	891	581	22	8
	12b		296		310		14
18.5.81	13a	918	581	954	609	36	28
	13b		337		345		8
19.5.81	14a	927	598	860	626	33	28
	14b		329		234		5
20.5.81	15a	894	529	812	534	18	5
	15b		365		378		13
21.5.81	16a	1014	660	1048	682	34	22
	16b		354		366		12
22.5.81	17	943	-	968	-	25	-
23.5.81	18	1012	-	1040	-	28	-
24.5.81	19	945	-	983	-	38	-
25.5.81	20	904	-	936	-	32	-
26.5.81	21	909	-	935	-	26	-

Tab. 18: Oxypurine (gemessen als Harnsäure) der 2. Diätphase
(mit Purinzulage)

Datum	Nr.	HS	HSox	Ox
		mg/24h	mg/24h	mg/24h
6.3.81	23	736	759	23
15.3.81	24	795	829	34
17.3.81	25	622	652	30
20.3.81	26	591	621	30
27.3.81	27	840	851	11
3.4.81	28	664	693	29
14.4.81	29	604	613	9
28.4.81	30	597	627	30

Tab. 19: Oxypurinwerte gemessen als Harnsäure während der Zwischenphase

Datum	Nr.	HS	HSox	Ox
		mg/24h	mg/24h	mg/24h
1.6.81	23	670	695	35
4.6.81	24	638	640	2
8.6.81	25	550	578	28
11.6.81	26	673	680	7
22.6.81	27	586	599	13
2.7.81	28	396	505	9
16.7.81	29	620	645	25
30.7.81	30	449	480	31

Tab. 20: Oxypurine gemessen als Harnsäure während der Nachphase unter Normalkost

Proben- nummer	A	$\bar{x}$	B	$\bar{x}$
	Einzelmessung		Einzelmessung	
1	0,013/0,013/0,013	0,013	0,008/0,009/0,010	0,009
2	0,015/0,015/0,015	0,015	0,020/0,020/0,020	0,020
3	0,017/0,017/0,017	0,017	0,019/0,025/0,021	0,022
4	0,017/0,017/0,017	0,017	0,018/0,018/0,019	0,018
5	0,015/0,015/0,015	0,015	0,013/0,013/0,014	0,013
6	0,015/0,015/0,014	0,015	0,020/0,021/0,021	0,021
7	0,016/0,016/0,016	0,016	0,017/0,016/0,016	0,016
8	0,016/0,016/0,017	0,016	0,021/0,021/0,022	0,021
9	0,017/0,018/0,018	0,018	0,018/0,018/0,020	0,019
10	0,016/0,016/0,016	0,016	0,017/0,021/0,022	0,020
11	0,015/0,015/0,015	0,015	0,015/0,015/0,016	0,015
12	0,011/0,011/0,011	0,011	0,021/0,023/0,024	0,023
13	0,020/0,020/0,020	0,020	0,015/0,015/0,016	0,015
14	0,017/0,017/0,017	0,017	0,022/0,022/0,022	0,022
15	0,019/0,019/0,019	0,019	0,020/0,022/0,023	0,022
16	0,020/0,020/0,020	0,020	0,024/0,026/0,026	0,025
17	0,019/0,019/0,019	0,019	0,024/0,025/0,026	0,025
18	0,018/0,018/0,018	0,018	0,017/0,018/0,019	0,018
19	0,020/0,020/0,020	0,020	0,020/0,021/0,022	0,021
20	0,018/0,018/0,018	0,018	0,018/0,018/0,017	0,018
x	0,017 $\pm$ 0,002		0,019 $\pm$ 0,004	

Tab. 21: Bestimmung der Eigenextinktion der Uricase

A: 1 ml Uricasegebrauchslösung + 2 ml Puffergebrauchslösung gegen 3 ml Puffergebrauchslösung

B: 1 ml Uricasegebrauchslösung + 1 ml XOD/KAT-Lösung
+ 1 ml Puffergebrauchslösung gegen 1 ml XOD/KAT-Lösung

+ 2 ml Puffergebrauchslösung

(siehe Seite 56)

Zur Beurteilung der Fehlerbreite der Methode wurde zunächst überprüft, ob die Zöllnersche Methode an Genauigkeit einbüßt, wenn statt 2 ml Probenverdünnung (Originalmethode) nur 1 ml (Oxypurinbestimmung) verwendet wird. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 22. Die Fehlerbreite bei 1 ml Probenverdünnung war einmal gleich groß (B) und einmal 88% größer (C) als diejenige der Originalmethode (A). Im Urin C lag die Fehlerbreite jedoch ebenfalls noch in einer tolerierbaren Größenordnung.

In den Urinen B und C der Tabelle 22 wurden außerdem die Oxypurinkonzentrationen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 aufgeführt. Die Fehlerbreite der Gesamtharnsäurebestimmung, also bei Zusatz des XOD/KAT-Gemisches, war einmal identisch (B), beim zweiten Urin (C) geringer als bei Bestimmung der Harnsäure allein. Die Variationskoeffizienten betrugen 0,8% (B) bzw. 1,5% (C) für die Harnsäurebestimmung und 0,9% (B) bzw. 1,1% (C) für die Gesamtharnsäurebestimmungen. Die Variationskoeffizienten für die Differenz der beiden Werte waren dagegen mit 23,7% (B) und 27,7% (C) wesentlich größer (Tabelle 23).

	A	B	C
n	9	9	10
$\bar{x}$ (mg/dl)	25,58	42,96	60,66
s	0,23	0,36	0,93
Variations- koeffizient	0,9	0,8	1,5

Tab. 22: Harnsäurebestimmung nach Zöllner (46) in drei verschiedenen Urinen.

A: 2 ml Probenverdünnung bei einem Gesamtvolumen des Ansatzes von 3 ml,

B und C: 1 ml Probenverdünnung pro 3 ml Gesamtvolumen.

Urin B (n = 9)	Harnsäure ohne XOD	Harnsäure mit XOD	Differenz = Oxypurinkonzentration
$\bar{x}$ (mg/dl)	42,96	45,24	2,28
s	0,36	0,39	0,54
Variations- koeffizient	0,8	0,9	23,7
Urin C (n = 10)			
$\bar{x}$ (mg/dl)	60,66	63,48	2,92
s	0,93	0,66	0,81
Variations- koeffizient	1,5	1,1	27,7

Tab. 23: Oxypurinbestimmung in zwei verschiedenen Urinen (B, C),
Bestimmung der Fehlerbreite wiederholter Messungen

4. Diskussion

4.1. Harnsäurewerte in Plasmen und Urinen, renale Harnsäure-Clearance und Urin-pH

Der Mittelwert der Plasmaharnsäure unter Normalkost lag bei der Versuchsperson K.M. bei 5,5 mg/dl. Unter purinfreier Formeldiät fiel er auf 3,2 mg/dl ab. Dieser nach Gleichgewichtseinstellung ab 11. Diättag (47) ermittelte Wert stimmt gut mit den von Griebisch und Zöllner (9) bestimmten Werten überein. Die Plasmaharnsäure unter Nukleotidzulage lag bei 7,1 mg/dl.

In der Vorperiode unter Normalkost fand sich bei der Versuchsperson K.M. ein Mittelwert der Harnsäureausscheidung von 630 mg/24h. Diese Menge liegt etwas über den von Griebisch und Zöllner (9) veröffentlichten Werten bei gesunden Versuchspersonen. Dies liegt vermutlich an der relativ fleischreichen Ernährung. Unter purinfreier Formeldiät sank die Harnsäureausscheidung im Urin auf durchschnittlich 328 mg/24h. Wie die Plasmaharnsäure stimmt auch dieser Wert mit dem von Griebisch und Zöllner (9) ermittelten Wert überein. Während der purinreichen Diätphase stabilisierte sich die tägliche Harnsäureausscheidung im Urin auf 971 mg. Dieser Wert ist wie die Plasmaharnsäure gering höher als der von Löffler et al. (26) bei zwei männlichen Versuchspersonen gefundene Wert. Im vorliegenden Fall war jedoch die Purinzulage größer (bezogen auf die Körperoberfläche). Die Schwankungen der Harnsäureausscheidung im Urin betrugen 5,1% des Mittelwertes in beiden Diätphasen.

Die Clearance-Werte unter purinfreier Kost lagen bei der Versuchsperson K.M. bei 7,2 ml/min. Dieser Wert ist höher als der, der von Löffler et al. (26) ermittelt wurde. Unter Purinzulage ergaben sich 9,5 ml/min. Im Gegensatz zu dem obigen Wert stimmt dieser mit dem von Löffler et al. (26) überein. Unter Normalkost lag der Clearance-Wert bei 8,5 ml/min.

Der pH-Wert des Urins wurde täglich gemessen, um eine Aussage darüber zu erhalten, ob hohe Nukleotidgaben den Urin-pH beeinflussen. Mit Hilfe des Tests auf Normalverteilung nach David, Pearson und Stephens (7) wurde untersucht, ob bei den pH-Werten eine Normalverteilung vorliegt. Das Ergebnis zeigte eine Nicht-normalverteilung. Daher wurde der Wilcoxontest für abhängige Stichproben (Paardifferenztest) verwendet. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% besteht zwischen beiden Diätphasen kein signifikanter Unterschied.

4.2. Poolgröße und Umsatz der Harnsäure

Die Poolgröße der Versuchsperson K.M. lag unter purinfreier Formeldiät mit 732 mg gering höher als die von Löffler et al. (24) unter der gleichen Diät ermittelten Werte. Die Umsatzrate unterschied sich nicht. Während der 2. Diätphase kam es jedoch zu einem sehr starken Anstieg des Pools auf 2116 mg. Der Umsatz lag bei 1863 mg/Tag. Diese Werte wurden bisher bei keiner Untersuchung erreicht. Lediglich Bowering et al. (5) fanden unter RNS-Zulage bei einer Versuchsperson einen Pool von 2127 mg. Der Umsatz mit 1404 mg/Tag lag aber im Bereich der Werte, die von Löffler et al. (24) veröffentlicht wurden.

Die intestinale Ausscheidung der Harnsäure steigt bei der Versuchsperson K.M. von 29% auf 48% unter Purinbelastung an. Eine Steigerung tritt auch bei den männlichen Versuchspersonen von Löffler et al. (26) auf und ist möglicherweise auf eine geringere Zunahme der renalen Harnsäure-Clearance bei Männern als bei Frauen unter Purinzulage zurückzuführen.

Gegen die hier verwendete Isotopenverdünnungsmethode ist ein Einwand zu erheben. Die Verwendung stabiler Isotopen erfordert eine relativ große Menge markierter Harnsäure. Daher wird die Abnahme der Isotopenkonzentration und damit die Umsatzrate nicht vom Pool A bestimmt, sondern von einem Pool, der zusätzlich noch die injizierte Harnsäure enthält. Diese machte bei unseren Untersuchungen unter purinfreier Diät ungefähr 1/4 des Pools aus und fällt daher

ins Gewicht. Es resultiert daraus möglicherweise eine zu große Umsatzrate (45). In der 2. Diätphase (purinreich) dagegen wird die Umsatzrate durch die injizierte Harnsäuremenge, die jetzt weniger als 10% des Pools ausmacht, nicht mehr so stark beeinflusst. Der Unterschied zwischen beiden Umsatzkonstanten wird durch diesen Effekt kleiner als er in Wirklichkeit ist.

4.3. Endogene Harnsäurebildung

Es war der Zweck der dargestellten Untersuchungen, die Größe der endogenen Harnsäurebildung unter oraler Purinzufuhr zu untersuchen. Betrachtet man lediglich die ^{15}N -Konzentration der Urinharnsäure (Abbildung 12), so findet man bei beiden Versuchspersonen in der 2. Diätperiode wesentlich geringere Werte. Durch die hohen AMP- und GMP-Zulagen kommt es in dieser Diätphase zu einem starken Anstieg der Plasma- und Urinharnsäure. Daraus resultiert eine Verdünnung der isotonen-markierten Harnsäure, die zu der niedrigeren ^{15}N -Anreicherung in der 2. Diätperiode führt. Außerdem ist bei dieser Betrachtungsweise nur der renal ausgeschiedene Isotopenanteil berücksichtigt. Da die enterale Harnsäureausscheidung aber ein sehr individueller Wert ist, der bei Purinzulage geringer oder auch größer werden kann, muß dieser ebenfalls in die Berechnungen miteinbezogen werden.

Wird unter Kontrollbedingungen (purinfreie Formeldiät) gleichzeitig der Gesamtumsatz der Harnsäure bestimmt (Injektion von ^{13}C -markierter Harnsäure), so kann einer bestimmten Menge der aus den Harnsäure-Vorläufern stammenden und als Harnsäure ausgeschiedenen Isotopen eine bestimmte Größe des Harnsäureumsatzes zugeordnet werden. Wiederholt man den Versuch unter veränderten Bedingungen, so läßt sich eine Veränderung der endogenen Synthese durch Veränderungen der ^{15}N -Gesamtausscheidung erfassen.

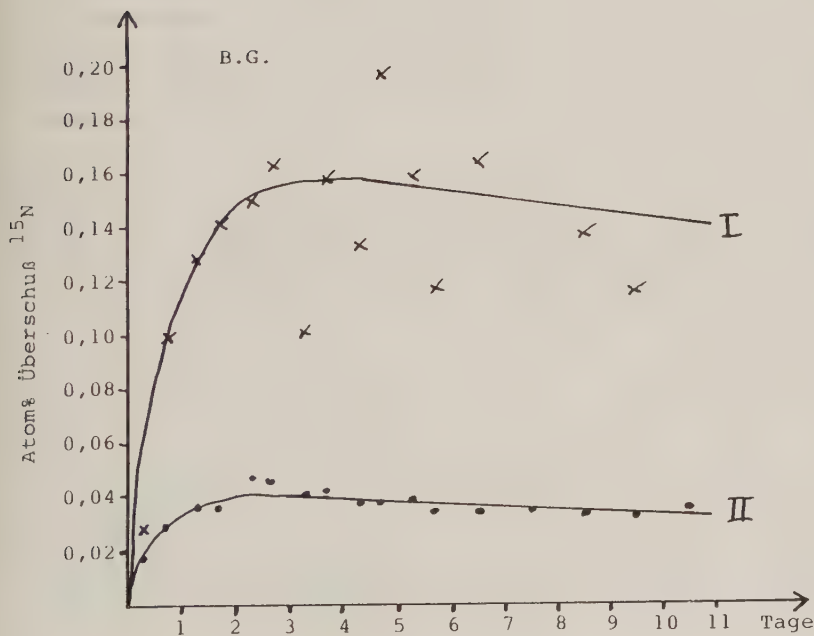
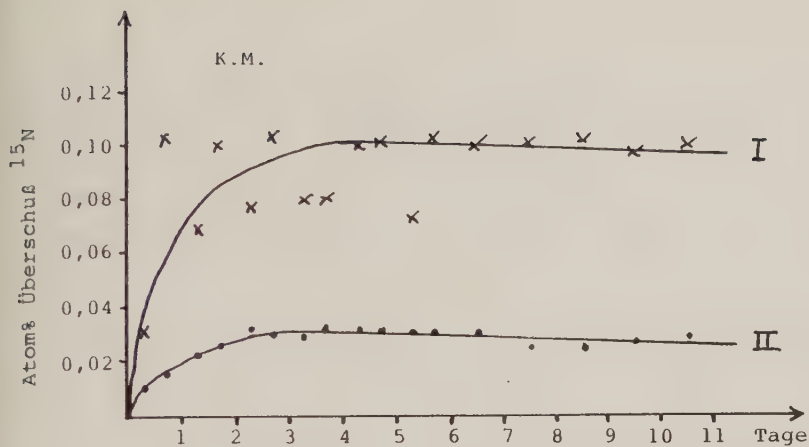


Abb. 12: Atom% Überschuß ^{15}N der Urinharnsäure unter Formelldiät allein (I) und unter Purinzulage (II) bei zwei gesunden Versuchspersonen.

In der vorliegenden Untersuchung wurde unter Nukleotidzulage bei der Versuchsperson B.G. eine Abnahme der ^{15}N -Ausscheidung von 0,293% (purinfrei) auf 0,276% (Purinzulage) der zugeführten Menge in 11 Tagen, bei der Versuchsperson K.M. eine Zunahme von 0,219% auf 0,256% gefunden (Tabelle 24). Da eine Zunahme der endogenen Harnsäurebildung unter oraler Purinzufuhr äußerst unwahrscheinlich ist, lassen unsere Ergebnisse vermuten, daß die endogene Harnsäurebildung unter oraler Purinzufuhr unbeeinflusst bleibt. Die Abbildungen 13 und 14 zeigen jedoch auch, daß die Fehlerbreite dieser Versuchsanordnung vermutlich bei ungefähr 20% liegt, geringe Veränderungen also nicht erfaßt werden können.

Die Untersuchungen von Seegmiller et al. (34, 36) scheinen, wie oben dargestellt (Abschnitt 3.1.), für eine Hemmung der endogenen Synthese durch orale Purin-Zufuhr zu sprechen. Bei diesen Untersuchungen wurden allerdings 4-Amino-5-Imidazol-Carboxamid bzw. Adenin verabreicht. Für Adenin existieren prinzipiell zwei Möglichkeiten der Metabolisierung, einmal die Oxydation durch die Xanthinoxidase zum 2,8-Dihydroxyadenin, zum zweiten die Pyrophosphorylierung mit Hilfe der APRT zum AMP. Nun finden sich aber weder Adenin noch seine Oxydationsprodukte beim Gesunden in nennenswerten Mengen im Urin; die Michaelis-Konstante der APRT für Adenin liegt erheblich über den in vivo maximal zu erwartenden Adeninkonzentrationen in den Geweben (37). Aus diesen beiden Tatsachen läßt sich ableiten, daß bei sehr hoher oraler Zufuhr des gut resorbierbaren Adenins eine plötzliche Vermehrung der AMP-Bildung einsetzt, die durch negative Rückkopplung zu einer Hemmung des Schlüsselenzyms der Purinbiosynthese führt. Durch orale Zufuhr anderer Basen ist theoretisch eine gleichartige Wirkung denkbar. Guanin und Xanthin werden jedoch aufgrund ihrer sehr schlechten Wasserlöslichkeit nur in minimalen Mengen, wenn überhaupt, resorbiert (14). Die Resorption von Hypoxanthin beträgt ca. 75% und ist damit schlechter als die von Adenin.

Menge (mg)			Anteil der zugeführten Dosis (%)	
	Diätphase I	Diätphase II	Diätphase I	Diätphase II
B.G.	1,81	1,71	0,293	0,276
K.M.	1,59	1,86	0,219	0,256

Tab. 24: ^{15}N -Ausscheidung beider Versuchspersonen in 11 Tagen als Harnsäure nach oraler Zufuhr von ^{15}N -Glycin (67 mg/kg Körpergewicht)

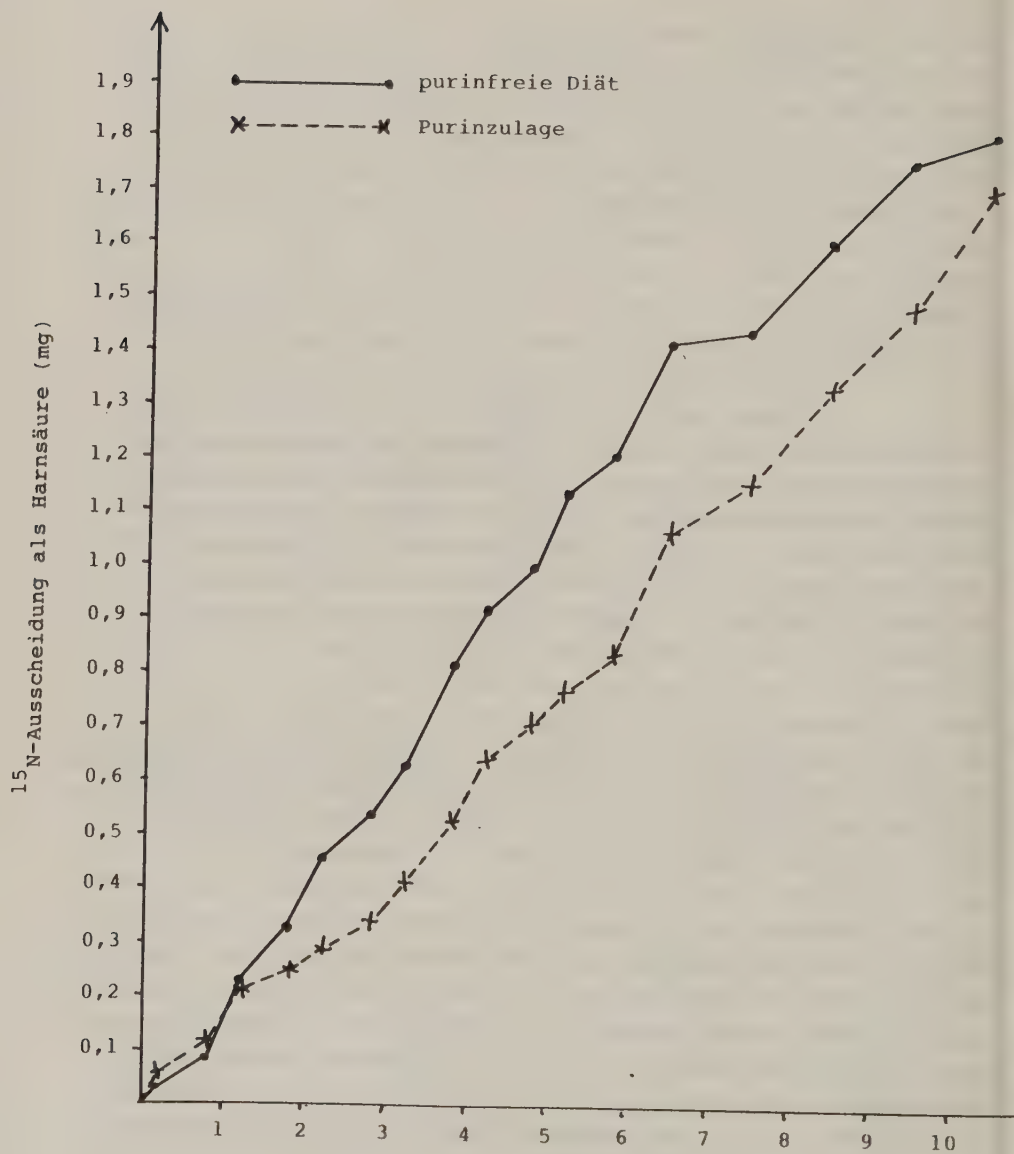


Abb. 13 : ^{15}N -Gesamtausscheidung (kumulativ) während beider Diätphasen (Versuchsperson B.G.)

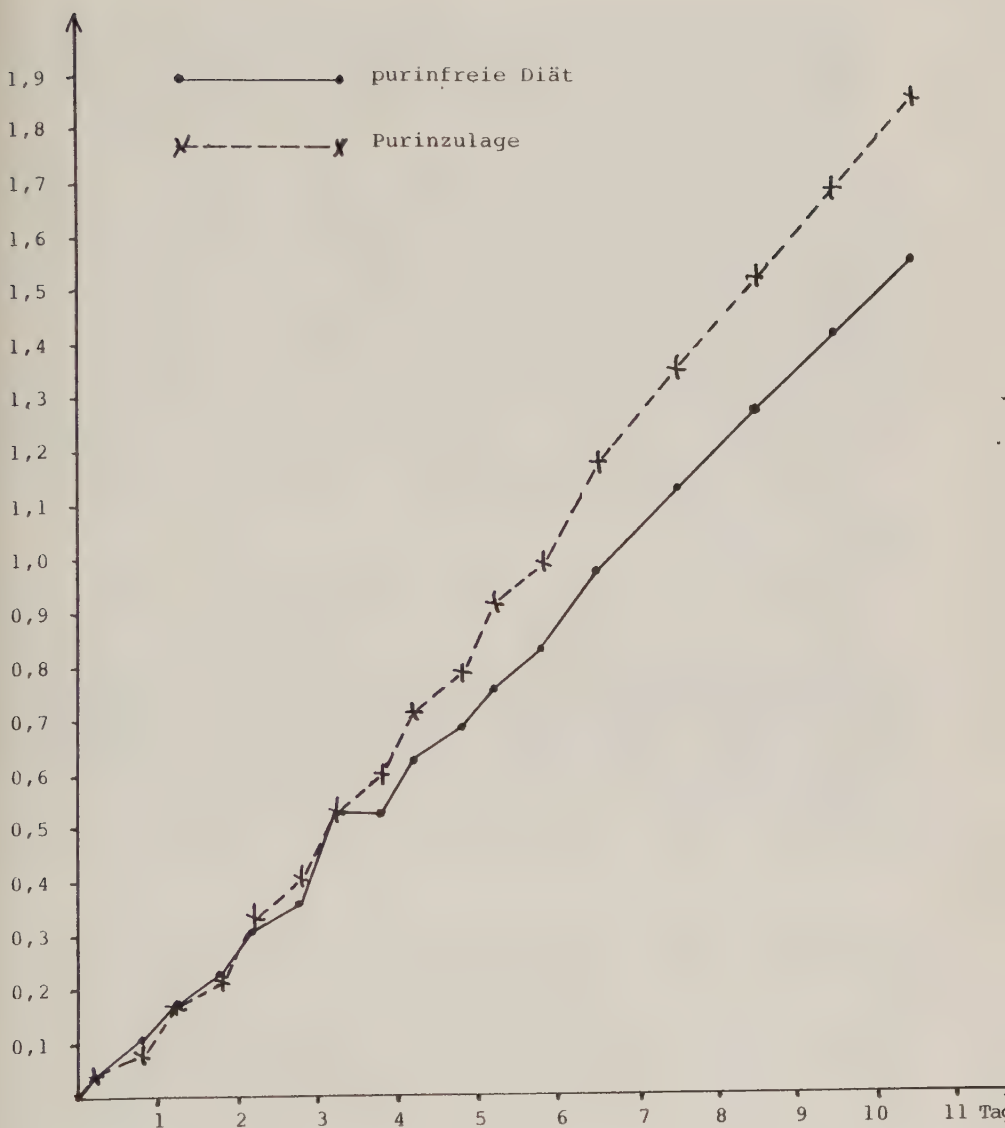


Abb. 14 : ^{15}N -Gesamtausscheidung (kumulativ) während beider Diätphasen (Versuchsperson K.M.)

Bei oraler Zufuhr von Nukleosiden oder Nukleotiden (diese werden vermutlich ebenfalls in Form von Nukleosiden resorbiert) ist eine Wirkung auf die Purinbiosynthese weniger wahrscheinlich. Sie können (mit Ausnahme von Adenosin durch die Adenosin-Kinase) nicht direkt zum Nukleotid phosphoryliert werden, sondern werden durch die Purinnukleosidphosphorylase unter Bindung eines Phosphatrests in Ribosephosphat und freie Basen zerlegt. Adenosin kann sowohl phosphoryliert als auch zu Inosin desaminiert werden. Bei steigenden Konzentrationen von Adenosin nimmt der über Inosin zum Hypoxanthin abgebaute Anteil im Vergleich zur AMP-Bildung jedoch rasch zu (3), so daß der direkten Nukleotidbildung und damit der Hemmung der Purinbiosynthese durch negative Rückkopplung Grenzen gesetzt sind. Der "Adenosinzyklus" (6), d. h. Wiederverwertung von Adenosin auf dem Wege $\text{Inosin} \longrightarrow \text{Hypoxanthin} \longrightarrow \text{IMP} \longrightarrow \text{AMP} \longrightarrow \text{AMP} \longrightarrow \text{AMP}$, scheint in intakten Zellen quantitativ unbedeutend zu sein (17, 29).

Zusammenfassend sprechen diese Überlegungen dafür, daß, wenn überhaupt eine Hemmung der endogenen Harnsäure-Bildung durch oral zugeführte Purine möglich ist, diese am ehesten durch Adenin zustande kommt. Gegen diese Möglichkeit sprechen experimentelle Beobachtungen, wonach oral zugeführtes Adenin sehr rasch nahezu quantitativ als Hypoxanthin, Xanthin und Harnsäure im Urin gefunden wird (33).

4.4. Renale Oxypurinausscheidung; Einfluß der Uricase-Eigenextinktion auf die Fehlerbreite der Oxypurinbestimmung; Fehlerbreite der Methode bei normaler renaler Oxypurinausscheidung

Die im Mittel täglich ausgeschiedenen Oxypurinmengen der Versuchsperson K.M. unterschieden sich trotz der unterschiedlichen Diäten mit 27,9 mg/24h (purinfrei) und 29,6 mg/24h (Purinzulage) nicht. Dies ist gut vereinbar mit den Ergebnissen von Marcolongo et al. (28). So können auch große Mengen an Hypoxanthin und Xanthin, die im Darm oder im Blut anfallen und nicht wiederverwertet werden, schnell zu Harnsäure oxydiert werden. Die Anteile von Hypoxanthin und Xanthin werden daher auch im Urin niedrig gehalten.

Die in der Zwischenphase und Nachphase (jeweils Normalkost) ermittelten Werte lagen bei 24,5 mg/24h und 18,8 mg/24h. Diese unterschiedlichen Werte dürften den natürlichen Schwankungen entsprechen.

Bei der Oxypurinbestimmung wurde eine unterschiedliche Eigenextinktion der Uricase allein und mit dem XOD/KAT-Gemisch beobachtet, obwohl sich dabei gleiche Werte ergeben müßten. Es traten niedrigere und höhere Werte auf. Außerdem wiesen auch die Dreifachwerte untereinander des Uricase/XOD/KAT-Gemisches größere Unterschiede auf als die der Uricase allein (Tabelle 23 unter Punkt 3.3.5.).

Nimmt man als Beispiel einen Urin mit einer Oxypurinkonzentration von 2,92 mg/dl Harnsäure, so entspricht eine Eigenextinktion von 0,005 Einheiten bereits 2,0 mg/dl Harnsäure ($\hat{=}$ 69% der Oxypurinkonzentration). Aus diesen Werten wird deutlich, welche große Rolle die Eigenextinktion der Uricase für die Genauigkeit der Methode spielt.

Die Schwankungen können mehrere Ursachen haben. Eine Möglichkeit ist ein Pipettierfehler, der jedoch unwahrscheinlich ist, da sonst auch die Uricase-Eigenextinktion ohne XOD/KAT-Gemisch größere Unregelmäßigkeiten zeigen müßte.

Eine andere Erklärung wäre eine Reaktion der Enzyme untereinander; diese würden aber nur Extinktionsänderungen in einer Richtung zeigen. Es traten jedoch Schwankungen nach oben und nach unten auf. Auch Langzeitmessungen sprechen dagegen, da diese keine Veränderungen der Eigenextinktion aufwiesen.

Eine dritte Möglichkeit, die Instabilität zu erklären, ist folgende:

Die Lösung für die Eigenextinktionsbestimmung der Uricase enthält durch das XOD/KAT-Gemisch noch 2 weitere Enzyme, die ebenfalls bei 293 nm absorbieren (Spektren siehe Abbildung 15). Man bekommt durch die zwei zusätzlichen Enzyme in den Küvetten einen sehr hohen "Untergrund", auf dem die Eigenextinktion der Uricase gemessen wird. Es ist möglich, daß die oben genannten Schwankungen durch diesen sog. Untergrund hervorgerufen werden. Um diese Untergrundabsorption so klein wie möglich zu halten, wurde die Enzymkonzentration so weit wie möglich reduziert. So kann es sein, daß die verwendeten 20 µl XOD bei einem Allopurinol-haltigen Urin die Reaktion nicht ausreichend schnell ablaufen lassen. Eine Erhöhung des Enzymgehalts im Ansatz führt nach dieser Theorie zu größeren Schwankungen, die aber bei höheren Oxypurinwerten nicht mehr so stark ins Gewicht fallen. Diese Untergrundabsorption erklärt außerdem die stärkeren Differenzen der Doppelwerte bei der Harnsäurebestimmung in Anwesenheit des XOD/KAT-Gemisches.

Zur Ermittlung der Fehlerbreite der Methode bei normaler renaler Oxypurinausscheidung wurde die Harnsäure in einem Urin mit allen Pipettierungen mehrmals bestimmt. Zuerst wurde die normale Zöllnersche Harnsäurebestimmung mit der etwas abgewandelten Methode (1 ml verdünnten Urin statt 2 ml), die für die Oxypurinbestimmung verwendet wurde, verglichen (Tabelle 22 unter Punkt 3.3.5.).

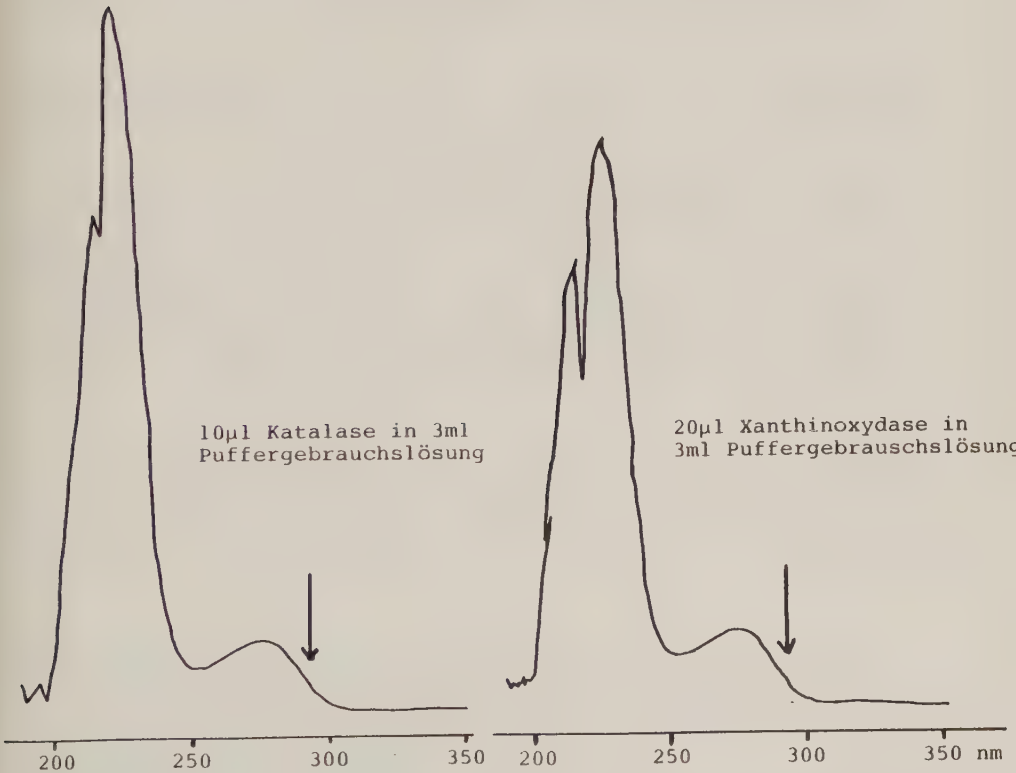
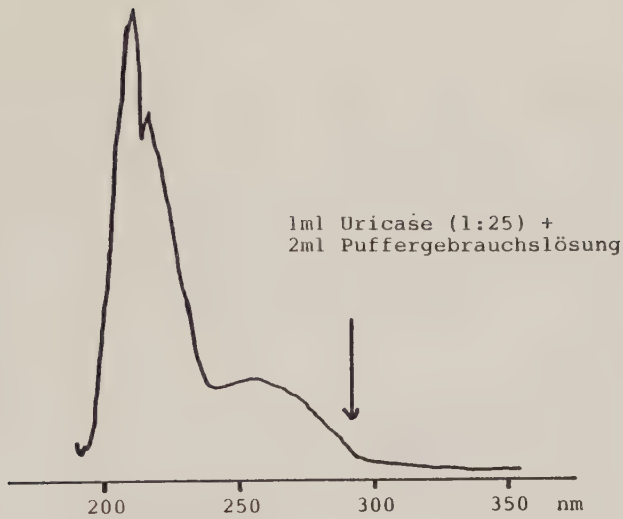


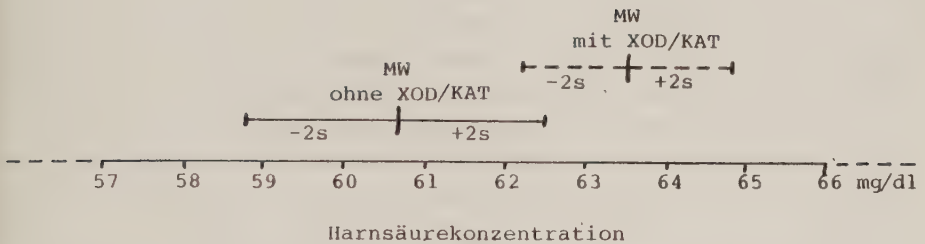
Abb. 15: Spektren der Enzyme (↓ = 293 nm = Wellenlänge der Harnsäuremessungen)

Die Werte zeigen einmal eine gleich große und einmal eine etwas größere Schwankungsbreite der 1 ml-Methode. Wegen der zusätzlichen Pipettierung weist die 1 ml-Methode einen etwas größeren s -Bereich auf, der aber noch toleriert werden kann. Mit den gleichen Urinen wurde außerdem eine Oxypurinstatistik erstellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 unter Punkt 3.3.5. zusammengestellt. Wie aus den Werten ersichtlich ist, weisen die Oxypurine in Bezug auf den Mittelwert sehr große Schwankungen auf. Etwas überraschend ist die im 1. Fall gleich große und im 2. Fall sogar kleinere Schwankungsbreite der Ergebnisse mit XOD/KAT, obwohl die Doppelwerte dieser Messungen oft weiter auseinander lagen als bei der Harnsäurebestimmung ohne XOD/KAT. Stellt man die statistischen Werte des 2. Urins graphisch dar, ergibt sich das in Abbildung 16 gezeigte Bild.

Man erkennt aus der Abbildung, daß sich die $2s$ -Bereiche der beiden Bestimmungen überlappen. Diese Überschneidung wird um so größer, je näher die Mittelwerte beieinander liegen (d. h. je kleiner die Oxypurinwerte sind) und je größer die Standardabweichung ist. Da die Oxypurine aus der Differenz beider Bestimmungen berechnet werden, können bei sehr geringer Oxypurinausscheidung negative Werte auftreten, was in einem Fall (Urin eines stationären Patienten ohne bekannte Störung des Harnsäurestoffwechsels) auch beobachtet wurde.

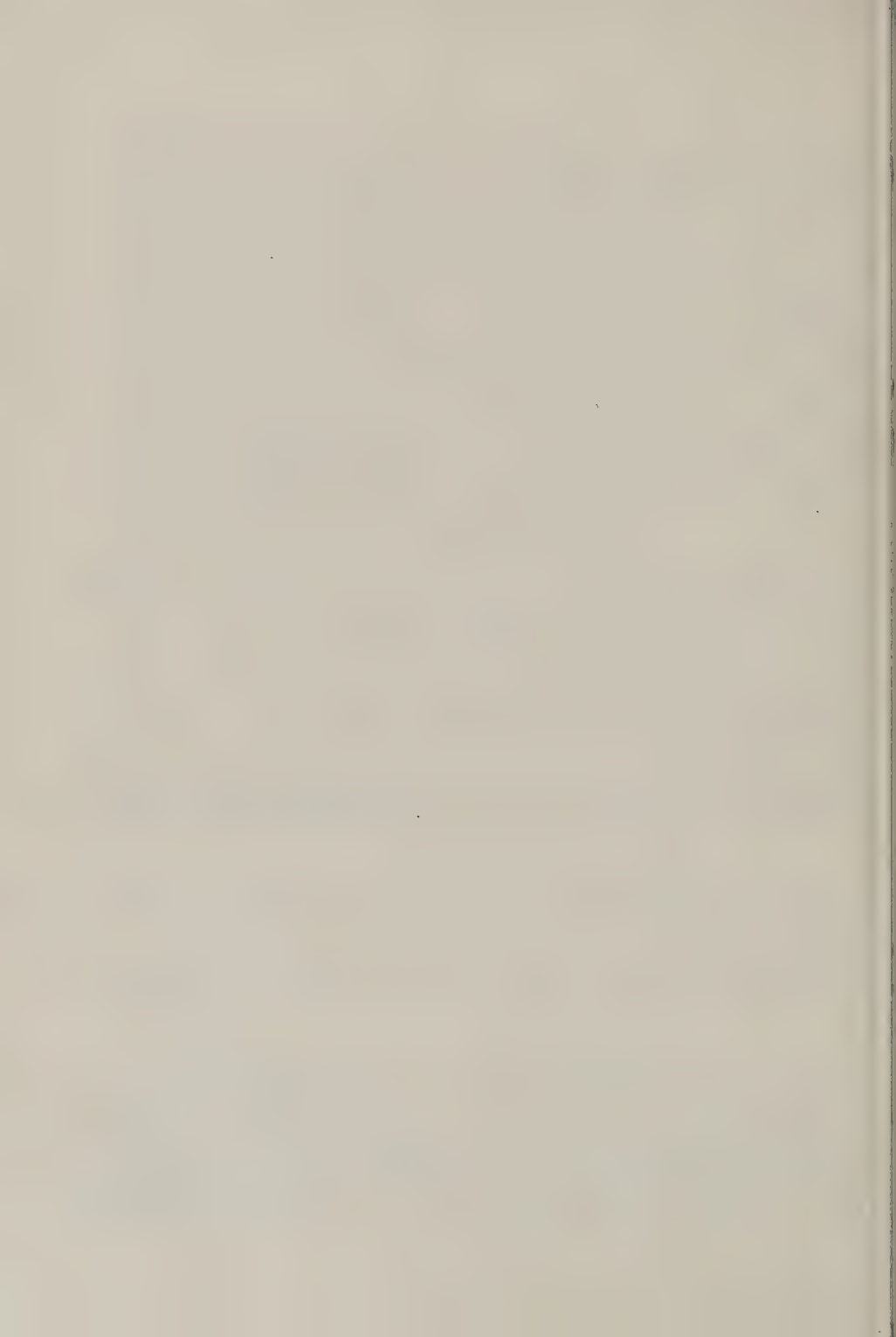
Als Fazit der Untersuchung läßt sich sagen, daß diese Methode der Oxypurinbestimmung für Normalwerte nur bedingt geeignet ist. Da die Eigenextinktionsschwankungen der Uricase fast 70% der Oxypurinkonzentration (berechnet als Harnsäure) ausmachen, können große Fehler entstehen.

Diese Bestimmungsmethode kann aber durchaus für Studien unter Allopurinolmedikation verwendet werden, da hier hohe Hypoxanthin- und Xanthinmengen vorliegen, die zur Verkleinerung des Streubereichs führen. Die $2s$ -Bereiche der beiden Harnsäurebestimmungen überlappen sich dann nicht mehr, so daß keine negativen Werte auftreten können.



(MW = Mittelwert, s = Standardabweichung)

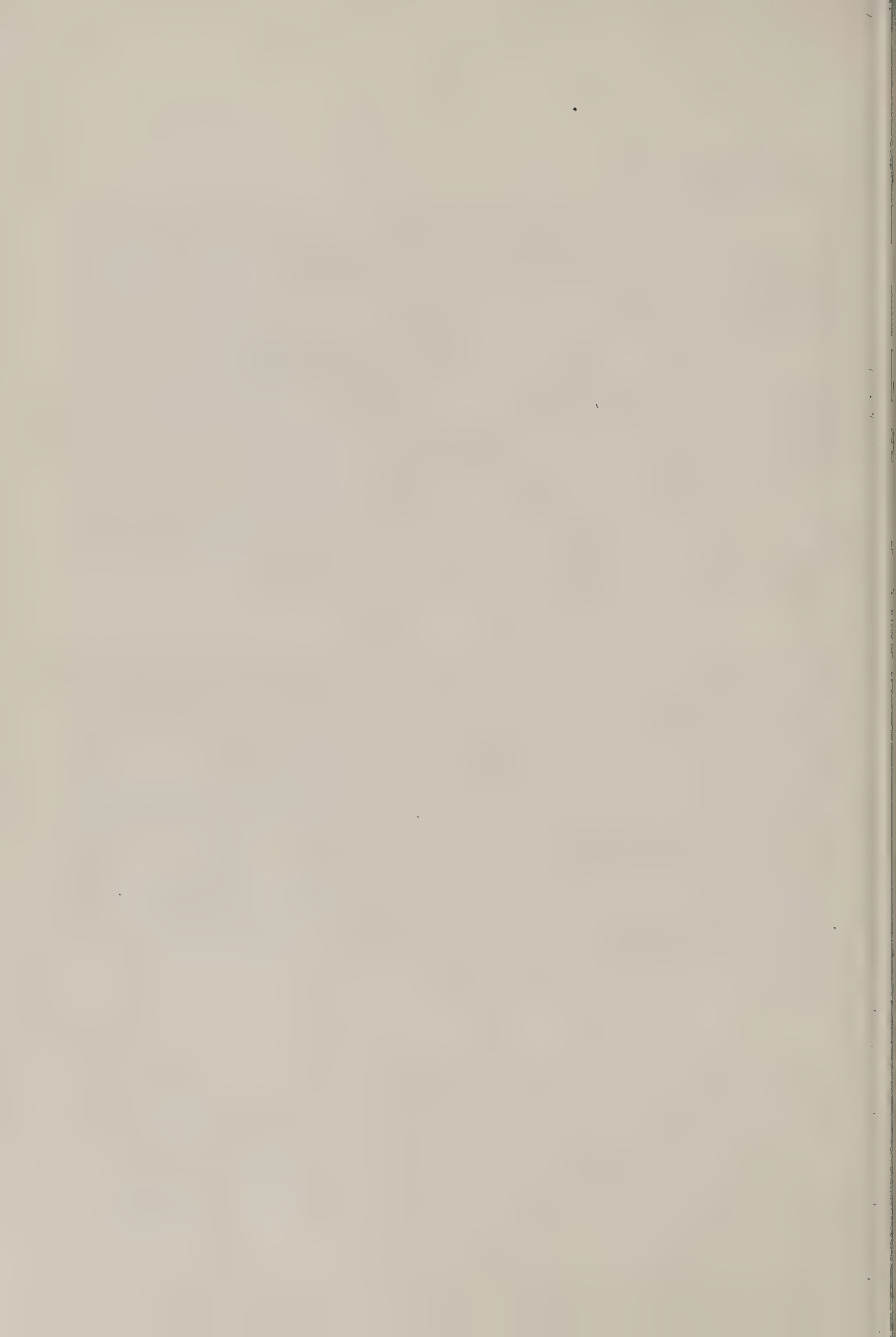
Abb. 16: Streubereich von 10 Messungen (jeweils als Doppelwert)
in einem Urin mit (Harnsäure + Harnsäure aus Oxypurinen)
und ohne XOD/KAT (Harnsäure)



5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde an zwei gesunden Versuchspersonen der Einfluß von Nahrungspurinen auf die endogene Harnsäuresynthese untersucht. Als Maß für die endogene Harnsäuresynthese diente der Einbau von ^{15}N in die Harnsäure nach oraler Zufuhr von ^{15}N markiertem Glycin. Die Harnsäure wurde säulenchromatographisch aus dem Urin isoliert, nach einem modifizierten Kjeldahlverfahren aufgeschlossen und der ^{15}N -Gehalt massenspektrometrisch gemessen. Gleichzeitig wurde nach dem Isotopenverdünnungsprinzip (^{13}C -Harnsäure) der Harnsäureumsatz bestimmt und die ^{15}N -Ausscheidung auf die Gesamt-Harnsäureausscheidung bezogen. Beim Vergleich der beiden Diätperioden (purinfrei-purinreich) ergab sich bei beiden Versuchspersonen kein Unterschied des ^{15}N -Einbaus in die Harnsäure. Die endogene Harnsäuresynthese wird somit durch Nahrungspurine nicht gehemmt.

Während dieses Versuchs wurden außerdem Untersuchungen über die Methode der enzymatischen Oxypurinbestimmung (gemessen als Harnsäure) durchgeführt. Es ergab sich dabei, daß die Methode bei Normalpersonen nur näherungsweise den Oxypuringehalt des Urins angeben kann. Die Eigenextinktion der Uricase variiert in Anwesenheit weiterer Enzyme (Xanthinoxidase und Katalase) sehr stark, so daß die Oxypurinkonzentrationen verfälscht werden. Diese Methode kann aber für Personen, die Allopurinol einnehmen, verwendet werden, da hier wesentlich größere Mengen an Oxypurinen vorliegen und folglich die Schwankungen der Eigenextinktion nicht mehr so stark ins Gewicht fallen.



6. Literaturverzeichnis

- 1) Abrams, R.: Some factors influencing nucleic acid purine renewal in the rat. Arch Biochem Biophys 33, 430 (1951)
- 2) Benedict, J.D., Forsham, P.H., Stetten, D.: The metabolism of uric acid in the normal and gouty human studied with the aid of isotopic uric acid. J Biol Chem 181, 183 (1949)
- 3) van den Berghe, G., Bronfman, M., Vanneste, R., Hers, H.-G.: The mechanism of adenosine triphosphate depletion in the liver after a load of fructose. A kinetic study of liver adenylate deaminase. Biochem J 162, 601 (1977)
- 4) Berlin, R.D., Hawkins, R.A.: Secretion of purines by the small intestine: general characteristics. Am J Physiol 215, 932 (1958)
- 5) Bowering, J., Calloway, D.H., Margen, S., Kaufman, N.A.: Dietary protein level and uric acid metabolism in normal man. J Nutr 100, 249 (1969)
- 6) Chan, T.-S., Ishii, K., Long, C., Green, H.: Purine excretion by mammalian cells deficient in adenosine kinase. J Cell Physiol 81, 315 (1973)
- 7) David, Pearson, Stephens: Test auf Normalverteilung. In: Ramm, B. und Hofmann, G. (Hrsg.): Biomathematik, Enke, Stuttgart, S. 158 (1982)
- 8) Gots, J.S.: Purine metabolism in bacteria. B. Feed back inhibition. J Biol Chem 228, 57 (1957)
- 9) Griebisch, A., Zöllner, N.: Normalwerte der Plasmaharnsäure in Süddeutschland. Vergleich mit Bestimmungen vor zehn Jahren. Z klin Chem klin Biochem 11, 346 (1973)

- 10) Gröbner, W., Zöllner, N.: Urikosurika. In: Zöllner, N., Gröbner, W. (Hrsg.): Handbuch der inneren Medizin, Bd. VII/3, Gicht. Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1976)
- 11) Gröbner, W.: Verdauungstrakt und Harnsäurestoffwechsel, Z. Gastroenterol, Erg. Gastroenterol. Verh. band 16, 116 (1979)
- 12) Gröbner, W., Löffler, W., Zöllner, N.: Der Einfluß verschiedener Nahrungspurine und -pyrimidine auf die Xanthinoxydaseaktivität des menschlichen Dünndarms. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 85, 659 (1979)
- 13) Gröbner, W.: Purinbiosynthese. In: Zöllner, N. (Hrsg.): Hyperurikämie und Gicht, Bd. I. Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 50 (1980)
- 14) Gröbner, W., Zöllner, N.: Der Einfluß von Nahrungspurinen und -pyrimidinen auf die Pyrimidinsynthese des Menschen. Klin. Wochenschr. 61, 1191 (1983)
- 15) Hall, A.P., Barry, P.E., Dawber, T.R., McNamara, P.M.: Epidemiology of gout and hyperuricemia. A long-term population study. Am J Med 42, 27 (1967)
- 16) Henderson, J.F.: Feedback inhibition of purine biosynthesis in ascites tumor cells. J Biol Chem 237, 2631 (1962)
- 17) Hershfield, M.S., Seegmiller, J.E.: Regulation of de novo purine synthesis in human lymphoblasts. Similar rates of de novo synthesis during growth by normal cells and mutants deficient in hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase activity. J Biol Chem 252, 6002 (1977)
- 18) Holmes, E.W., Wyngaarden, J.B., Kelley, W.N.: Human glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase: Two molecular forms inconvertible by purine ribonucleotides and phosphoribosylpyrophosphate. J Biol Chem 248, 6035 (1973)

- 19) Holmes, E.W., Wyngaarden, J.B.: Hereditary xanthinuria. In: Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L., Brown, M.S. (Hrsg.): The metabolic basis of inherited disease. 5. Auflage, McGraw-Hill, New York, S. 1192 (1983)
- 20) Johnson, L.A. Emmerson, B.T.: Isolation of crystalline uric acid from urine, for urate pool or turnover measurements. Clin Chim Acta 41, 389 (1972)
- 21) Kelley, W.N., Wyngaarden, J.B.: Clinical syndromes associated with hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency. In: Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L., Brown, M.S. (Hrsg.): The metabolic basis of inherited disease. 5. Auflage, McGraw-Hill, New York, S. 1115 (1983)
- 22) Klinenberg, J.R., Goldfinger, S., Bradley, K.H., Seegmiller, J.E.: An enzymatic spectrophotometric method for the determination of xanthine and hypoxanthine. Clin Chem J 13, 834 (1967)
- 23) Löffler, W.: Harnsäurekonzentration in Serum und Geweben. In: Zöllner, N. (Hrsg.): Hyperurikämie und Gicht, Bd. 1. Springer, Berlin-Heidelberg-New York, S. 48 (1980)
- 24) Löffler, W., Gröbner, W., Zöllner, N.: Influence of dietary protein on serum and uric acid. Adv exp Med Biol 122 A, 209 (1980)
- 25) Löffler, W., Gröbner, W., Zöllner, N.: Nutrition and uric acid metabolism: plasma level, turnover excretion. Fortschr Urol Nephrol 16 (1981)
- 26) Löffler, W., Gröbner, W., Medina, R., Zöllner, N.: Influence of dietary purines on pool size, turnover and excretion of uric acid during balance conditions. Res Exp Med (Berl) 181, 113 (1982)

- 27) Löffler, W., Gröbner, W., Wolfram, G., Zöllner, N.: Die endogene Harnsäuresynthese des Menschen. Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 89, 999 (1983)
- 28) Marcolongo, R., Marinello, E., Pompucci, G., Pagani, R.: The role of xanthine oxidase in hyperuricemic states. Arthr Rheum 17, 430 (1974)
- 29) Matsumoto, S.S., Raivio, K.O., Seegmiller, J.E.: Adenine nucleotide degradation during energy depletion in human lymphoblasts. Adenosine accumulation and adenylate energy charge correlation. J Biol Chem 254, 8956 (1979)
- 30) Mikkelsen, W.M., Dodge, H.J., Valkenburg, H.A., Himes, S.: The distribution of serum uric acid values in a population unselected as to gout or hyperuricemia. Tecumseh, Michigan, 1959-1960. Am J Med 39, 242 (1965)
- 31) Nierlich, D.P., Magasanik, B.: Regulation of purine ribonucleotide synthesis by end product inhibition. The effect of adenine and guanine ribonucleotides on the 5-phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase of aerobacteraerogenes. J Biol Chem 240, 358 (1965)
- 32) Nugent, C.A., Tyler, F.H.: The renal excretion of uric acid in patients with gout and in nongouty subjects. J Clin Invest 38, 1890 (1959)
- 33) Potter, C.F., Cadenhead, A., Simmonds, H.A., Cameron, J.S.: Differential Absorption of purine nucleotides, nucleosides and bases. Adv exp Med Biol 122 A, 203 (1980)
- 34) Seegmiller, J.E., Laster, L., Stetten, D.: Incorporation of 4-Amino-5-Imidazole-Carboxamide-4-C¹³ into uric acid in the normal human. J Biol Chem 216, 653 (1955)
- 35) Seegmiller, J.E., Grayzel, A.J., Laster, L., Lidder, L.: Uric acid production in gout. J Clin Invest 40, 1304 (1961)

- 36) Seegmiller, J.E., Klinenberg, J.R., Miller, J., Watts, R.W.E.: Suppression of glycine-¹⁵N incorporation into urinary uric acid by adenine-8-¹³C in normal and gouty subjects. *J Clin Invest* 47 (1968)
- 37) Simmonds, H.A., Van Acker, K.J.: Adenin phosphoribosyltransferase deficiency: 2,8-Dihydroxyadenine lithiasis. In: Stanbury, W.N., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L., Brown, M.S. (Hrsg.): *The metabolic basis of inherited disease*. 5. Auflage, McGraw-Hill, New York, 1144 (1983)
- 38) Sorensen, L.B.: Extrarenal disposal of uric acid. In: Kelley, W.N., Weiner, I.H. (Hrsg.): *Uric acid*. Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1978)
- 39) Sorensen, L.B.: Gout secondary to chronic renal disease: studies on urate metabolism. *Am Rheum Dis* 39, 424 (1980)
- 40) Waslien, C.J., Calloway, D.H., Margan, S.: Uric acid production of men fed graded amounts of egg protein and yeast nucleic acid. *Am J Clin Nutr* 21, 892 (1968)
- 41) Watts, R.W.E., Crawhall, J.C.: The first glycine metabolic pool in man. *Biochem J* 73, 277 (1959)
- 42) Winkler, F.J., Schmidt, H.-L.: Einsatzmöglichkeiten der ¹³C-Isotopen-Massenspektrometrie in der Lebensmitteluntersuchung. *Z Lebensm Unters Forsch* 171, 85 (1980)
- 43) Wyngaarden, J.B., Kelley, W.N.: Gout. In: Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L., Brown, M.S. (Hrsg.): *The metabolic basis of inherited disease*. 5. Auflage, McGraw-Hill, New York, 889, 1043 (1983)
- 44) Zöllner, N.: Energiestoffwechsel, In: Zöllner, N. (Hrsg.): *Thannhausers Lehrbuch des Stoffwechsels und der Stoffwechselkrankheiten*, 2. Auflage. Thieme, Stuttgart (1957)

- 45) Zöllner, N.: Moderne Gichtprobleme. Ätiologie, Pathogenese, Klinik. *Ergeb Inn Med Kinderheilk* 14, 321 (1960)
- 46) Zöllner, N.: Eine einfache Modifikation der enzymatischen Harnsäurebestimmung. *Z klin Chem klin Biochem* 1, 178 (1963)
- 47) Zöllner, N., Griebisch, A., Gröbner, W.: Einfluß verschiedener Purine auf den Harnsäurestoffwechsel. *Ernährungsumschau* 3, 796 (1972)
- 48) Zöllner, N.: Diet and gout. *Proc 9th int Congr Nutrition.. Karger, Basel* (1975)
- 49) Zöllner, N., Gröbner, W.: Dietary feedback regulation of purine and pyrimidine biosynthesis in man. *Ciba Found Symp* 48, 165 (1977)
- 50) Zöllner, N.: *Hyperurikämie und Gicht, Bd. I.* Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 50 (1980)

7. Lebenslauf

Persönliche Daten

geboren am	30.05.53
in	München
Eltern	Dr. Hans Mayerhöfer, Arzt für Allgemeinmedizin Ehefrau Lotte, geb. Nicolai
Familienstand	verheiratet, 1 Kind
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	katholisch

Ausbildungsdaten

Schulausbildung	1959-1963	Volksschule Ismaning
	1963-1967	Priv. Gymnasium Dr. Überreiter, München
	1967-1973	Ludwigsgymnasium München Abschluß: Abitur
Hochschulstudium	1973-1974	Universität München, Fach- richtung Mathematik und Physik
	1974-1978	Universität München, Fach- richtung Chemie, 1977 Vordiplom
	1978-1983	Universität München, Fach- richtung Humanmedizin, Abschlußprüfung am 27.10.83, Approbation am 07.11.83

Berufspraxis	01.12.83-	als Assistenzarzt in
	31.03.84	einer Allgemeinpraxis
	seit 16.04.84	als wissenschaftlicher Assistent in der Medizinischen Poliklinik der Universität München

